(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2006 年9 月21 日 (21.09.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/098415 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 9/127 (2006.01) *A61K 47/34* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2006/305304

(22) 国際出願日: 2006 年3 月10 日 (10.03.2006)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2005-075663 2005 年3 月16 日 (16.03.2005) JP
特願2005-252366 2005 年8 月31 日 (31.08.2005) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社オキシジェニクス (OXYGENIX CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1050001 東京都港区虎ノ門四丁目１番１号 Tokyo (JP). 学校法人早稲田大学 (WASEDA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1698050 東京都新宿区戸塚町一丁目１０４番地 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 武岡 真司 (TAKEOKA, Shinji) [JP/JP]; 〒1698555 東京都新宿区大久保３丁目４－１ 学校法人早稲田大学 理工学術院内 Tokyo (JP). 岡村 陽介 (OKAMURA, Yosuke) [JP/JP]; 〒1698555 東京都新宿区大久保３丁目４－１ 学校法人早稲田大学 理工学術院内 Tokyo (JP). 金澤 秀雄 (KANAZAWA, Hideo) [JP/JP]; 〒1698555 東京都新宿区大久保３丁目４－１ 学校法人早稲田大学 理工学術院内 Tokyo (JP). 久本 秀治 (HISAMOTO, Shuji) [JP/JP]; 〒1698555 東京都新宿区大久保３丁目４－１ 学校法人早稲田大学 理工学術院内 Tokyo (JP). 久保田 恒平 (KUBOTA, Kohei) [JP/JP]; 〒1698555 東京都新宿区大久保３丁目４－１ 学校法人早稲田大学 理工学術院内 Tokyo (JP). 小幡 洋輔 (OBATA, Yosuke) [JP/JP]; 〒1698555 東京都新宿区大久保３丁目４－１ 学校法人早稲田大学 理工学術院内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 小林 浩， 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲２－８－７ 福岡ビル９階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) **Title:** DRUG CARRIER

(54) 発明の名称: 薬物運搬体

(57) **Abstract:** An object of the invention is to provide a dug carrier that is capable of regulating pharmacokinetics in vivo. The invention is directed to the drug carrier comprising a molecular assembly by which a dug is supported and the object can be achieved by releasing part of amphiphilic molecules constituting the molecular assembly from the molecular assembly due to external environmental change. A phenomenon in which the amphiphilic molecule is released from the molecular assembly because a hydrophilic-hydrophobic balance is shifted to hydrophilicity by external environmental change is utilized in the invention.

(57) 要約: 本発明は、生体内における薬物動態を制御することのできる薬物運搬体を提供することを課題とする。本発明は、薬物が担持されている分子集合体を含む薬物運搬体であって、その分子集合体を構成する一部の両親媒性分子が外部環境の変化によって分子集合体から遊離することによって、上記課題を解決することができる。本発明においては、両親媒性分子が外部環境の変化によって親水性–疎水性バランスが親水性に傾くために分子集合体から遊離する現象を利用する。

WO 2006/098415 A1

明　細　書

薬物運搬体

技術分野

本発明は、分子集合体に薬物を担持させ、分子集合体の構成成分の一部である両親媒性分子が分子集合体から遊離する現象を利用して薬物動態を制御する薬物運搬体製剤に関する。

背景技術

現在、薬物を分子集合体中に組み込んだ薬物運搬体をドラッグデリバリーシステムとして利用する試みが盛んに研究され、一部は既に臨床応用されている。例えば、親水性の薬物に関しては、リン脂質分子が集合して構築する二分子膜小胞体、いわゆるリポソームの内水相に内包させた薬物運搬体がある。また、疎水性の薬物に関しては、o/w エマルジョンであるリピッドマイクロスフェア、界面活性剤または両親媒性高分子が構築するミセルなどの分子集合体の疎水部に物理的に溶解あるいは化学的に担持させた薬物運搬体がある。あるいはリポソームの二分子膜疎水部に疎水性薬物を包埋させる場合もある。

これらの薬物運搬体を例えば血中に投与すると、主に細網内皮系の発達した臓器(例えば脾臓、肝臓など)の貪食細胞に取り込まれるため、血中滞留時間は著しく短く、これらの臓器を標的にする薬物運搬体に適用が限られる。そのため、血中滞留時間を延長させる方策が採られている。例えば水溶性で生体適合性の高い高分子であるポリエチレングリコール鎖などを被覆したリポソームが、いわゆるステルスリポソームとして多用されている。この技術は、Abuchowski らの血清アルブミンをポリエチレングリコール鎖で修飾する研究からはじまり、すでに1990 年代前半にアデノシンデアミナーゼ、アスパラギナーゼを修飾したものが臨床認可されている。ポリエチレングリコール鎖にて蛋白質を修飾することで、抗原性の減少、血中滞留性の増大などの効果が得られることが報告されている。

ポリエチレングリコール鎖の表面修飾リポソーム(PEG-リポソーム)は、細網内

皮系の取り込みを回避し、長時間血中に滞留することができる。この特性を生かした、固形癌組織へのパッシブターゲティングがドラッグデリバリーシステムの戦略の一つになっている。

一般的に固形癌組織は、分岐の多い新生血管が異常に発達し、その血管壁は薄く不連続という特徴を有している。血中滞留性の高い PEG-リポソームは、そのサイズを 300 nm 以下にすると、癌組織の透過性の高い血管壁を介して血中から間質へ漏出することが可能となり、一旦出たものは管腔側に戻りにくく蓄積するようになる。そのため、PEG-リポソームは、低分子の薬物よりも固形癌組織に高い集積性が得られるという効果、すなわち、EPR 効果を持っており、腫瘍組織へのターゲティングにおいては重要な要素のひとつである。

最近では、リポソーム表面に組織や臓器を特異的に認識する抗体、インテグリンの一部、またはリガンド分子を担持して、積極的な認識によって組織または臓器をターゲティングする試みが検討されている。これをアクティブターゲティングと呼んでいる。血中滞留時間を延長させる目的でポリエチレングリコール鎖にて表面修飾されたリポソームでは、この認識部位がポリエチレングリコール鎖で隠されているとアクティブターゲティングが阻害されるため、ポリエチレングリコール鎖の末端の一部に認識部位を結合させる方法が採用されている。

一方、別の側面であるリポソームの安定性から考えると、分子集合体であるリポソームはそれを構成する両親媒性分子を何らかのエネルギー照射にて水中に分散させ、疎水性相互作用により自己集合する現象を利用して調製するため、物理化学的には準安定状態である。従って、保存時に凝集または融合が起こり、やがて沈殿が起こる場合がある。そのため、血中安定性も考慮してリポソームの構成脂質には負電荷脂質またはコレステロールを混合させ、ポリエチレングリコール鎖または糖鎖でリポソームの表面を修飾することにより、その解決が図られてきた。そのため、ポリエチレングリコール鎖によるリポソームの表面修飾の方法が重要であり、ポリエチレングリコール鎖をジアシルホスファチジルエタノールアミンまたはコレステロールに結合させた脂質が広く使用されている。このポリエチレングリコール結合ジアシル型脂質はリン脂質二分子膜小胞体から遊離することが報告されている(J.R.Silvius and M.J.Zuckermann, Biochemistry, 32, 3153, 1993、

K.Sou, *et al*, Bioconjugate, 11, 372, 2000)。この脂質の遊離速度は、ポリエチレングリコール鎖の分子量と疎水部の大きさ（アシル鎖を構成する炭素数）、すなわち親水性—疎水性バランスによって左右され、親水部が相対的に大きい脂質が遊離し易い。そこで、我々は、モノデンドロン構造を利用して、一本のポリエチレングリコール鎖と多数のアルキル鎖を結合させた脂質を開発し、分子量の大きなポリエチレングリコール鎖を結合させても脱離し難い一連の両親媒性分子を手にすることができた(特許第 3181276 号公報)。

発明の開示

上述した研究背景の中で、本発明者らは、これまで合成した一連のポリエチレングリコール結合脂質を用いて、ポリエチレングリコール結合脂質のポリエチレングリコール鎖の末端に更に親水性の認識部位、例えば蛋白質などを結合させた場合、親水性－疎水性バランスがより親水性に傾くために遊離が起きてしまうことを明らかにした。このため、親水性の認識部位が遊離しないように当該認識部位をリポソームの表面に安定担持させる目的で、結合脂質の疎水部を大きくさせることを検討してきた。しかし、結果的には依然として遊離が起こり、完全に遊離を抑えることは困難であった。そして、完全に遊離を抑制する分子設計としては、例えば膜貫通蛋白質のようにペプチド鎖を複数回膜に貫通させた分子構造が必要であると思われた。これに対し、本発明者らは蛋白質結合ポリエチレングリコール鎖結合脂質の遊離現象を好ましくないものと考えずに、むしろ遊離速度を制御することによって、リポソームの血中滞留性の制御や薬物の徐放性の制御につながるとの発想の転換から、遊離現象を積極的に利用する方針への変更を検討するに至った。

本発明者らは、両親媒性分子からなる分子集合体に薬物を担持させ、分子集合体を構成する脂質（例えばポリエチレングリコール結合脂質）の遊離現象を利用し、薬物運搬体の体内動態が制御される薬物運搬体製剤を提供することを本発明の課題のひとつとした。さらに拡張して、希釈効果（濃度変化）、温度変化、pH 変化、化学反応など様々な外部刺激によってその遊離が促進されれば、薬物運搬体の体内動態の積極的な制御法として利用できるので、これも課題のひとつ

とした。そして、本課題をリン脂質の分子集合体であるリポソームのみならず、エマルジョンまたはミセルなどの分子集合系を基盤とした薬物運搬体全体への適応に拡大させることも検討した。

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意検討した結果、分子集合体を構成する両親媒性分子を所定の分子構造とし、当該分子集合体の外部環境を変えることで両親媒性分子の遊離を任意に調節し得ることを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は、薬物が担持されている分子集合体を含む薬物運搬体であって、その分子集合体を構成する一部の両親媒性分子が外部環境の変化によって分子集合体から遊離することによって、生体内における薬物動態が制御される薬物運搬体である。より具体的に、本発明は、以下に示した薬物運搬体等を提供するものである。

（１）薬物が担持されている分子集合体を含む薬物運搬体であって、その分子集合体を構成する一部の両親媒性分子が外部環境の変化によって分子集合体から遊離することによって、生体内における薬物動態が制御される薬物運搬体。

（２）遊離する両親媒性分子が、

(薬物)－(結合部位Ａ)－(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)　　1

または

(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)－(結合部位Ｃ)－(薬物)　　2

［式中、結合部位Ａは親水部と薬物とを結合する部位であり、結合部位Ｂは親水部と疎水部とを結合する部位であり、結合部位Ｃは疎水部と薬物とを結合する部位である］で表されるものである（１）記載の薬物運搬体。

（３）遊離する両親媒性分子が、

(親水性高分子)－(結合部位Ｄ)－(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)　　3

または

(認識部位)－(結合部位Ｅ)－(親水性高分子)－(結合部位Ｄ)－(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)　　4

［式中、結合部位Ｂは親水部と疎水部とを結合する部位であり、結合部位Ｄは親水性高分子と親水部とを結合する部位であり、結合部位Ｅは認識部位と親水性高

分子とを結合する部位である］で表され、この両親媒性分子の遊離によって生体内における薬物動態が制御される（１）記載の薬物運搬体。

（４）　(認識部位)－(結合部位Ｅ)－(親水部)―(結合部位Ｂ)－(疎水部)　　５

［式中、結合部位Ｂは親水部と疎水部とを結合する部位であり、結合部位Ｅは認識部位と親水部とを結合する部位である］で表される両親媒性分子５が担持されている分子集合体であって、該分子集合体に導入されている

(親水性高分子)－(結合部位Ｄ)－(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)　　３

［式中、結合部位Ｂは親水部と疎水部とを結合する部位であり、結合部位Ｄは親水性高分子と親水部とを結合する部位である］で表される両親媒性分子３が両親媒性分子５の認識を阻害する状態にあって、両親媒性分子３の遊離によって両親媒性分子５の認識能が発現されることで生体内における薬物動態が制御されるものである（１）記載の薬物運搬体。

（５）遊離する両親媒性分子の疎水部が２本以上１８本以下の炭化水素鎖を含有するものである（１）から（４）までのいずれかに記載の薬物運搬体。

（６）遊離する両親媒性分子の結合部位Ｂにオリゴ糖鎖、オリゴペプチド鎖、ポリエステル鎖、ビニル系オリゴマーまたはデンドロン構造を含む（５）記載の薬物運搬体。

（７）遊離する両親媒性分子が、

(薬物)－(結合部位Ａ)－(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)―(結合部位Ｂ)－(親水部)　６

または

(薬物)－(結合部位Ａ)－(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)―(結合部位Ｂ)－(親水部)－(結合部位Ａ)－(薬物)　　７

［式中、結合部位Ａは薬物と親水部とを結合する部位であり、結合部位Ｂは親水部と疎水部とを結合する部位である］で表されるものである（１）記載の薬物運搬体。

（８）遊離する両親媒性分子が、

(親水性高分子)－(結合部位Ｄ)－(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)―(結合部位Ｂ)－(親水部)　　８

または

(親水性高分子)－(結合部位Ｄ)－(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)―(結合部位Ｂ)－(親水部)―(結合部位Ｄ)―(親水性高分子)　９

または

(認識部位)－(結合部位Ｅ)－(親水性高分子)－(結合部位Ｄ)－(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)－(結合部位Ｂ)－(親水部)―(結合部位Ｄ)―(親水性高分子)　１０

または

(認識部位)－(結合部位Ｅ)－(親水性高分子)－(結合部位Ｄ)－(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)－(結合部位Ｂ)－(親水部)―(結合部位Ｄ)―(親水性高分子)－(結合部位Ｅ)－(認識部位)　１１

［式中、結合部位Ｂは親水部と疎水部とを結合する部位であり、結合部位Ｄは親水性高分子と親水部とを結合する部位であり、結合部位Ｅは認識部位と親水性高分子とを結合する部位である］で表され、この両親媒性分子の遊離によって生体内における薬物動態が制御されるものである（１）記載の薬物運搬体。

（９）遊離する両親媒性分子の親水部または親水性高分子がポリエチレングリコールを含有するものである（１）から（８）までのいずれかに記載の薬物運搬体。

（１０）分子集合体からの両親媒性分子の遊離が、この分子集合体の分散液の希釈によるものである（１）から（９）までのいずれかに記載の薬物運搬体。

（１１）分子集合体からの両親媒性分子の遊離が、温度変化によるものである（１）から（１０）までのいずれかに記載の薬物運搬体。

（１２）分子集合体からの両親媒性分子の遊離が、プロトン、アルカリ金属イオンおよびアルカリ土類金属イオンからなる群から選択される少なくとも１種の濃度変化によるものである（１）から（１１）までのいずれかに記載の薬物運搬体。

（１３）遊離する両親媒性分子の親水部と疎水部とを結合する部位または疎水部に、エステル結合、アミド結合、ウレタン結合及びシッフ塩基からなる群から選択される少なくとも１種の結合を含有し、かつ分子集合体からの両親媒性分子の遊離がこれらの結合の加水分解によるものである（１）から（１２）までのいずれかに記載の薬物運搬体。

（１４）遊離する両親媒性分子の親水部と疎水部とを結合する部位または疎水部にジスルフィド結合を含有し、かつ分子集合体からの両親媒性分子の遊離が、ジスルフィド結合の還元によるものである（１）から（１３）までのいずれかに記載の薬物運搬体。

（１５）両親媒性分子の遊離に伴う分子集合構造の一部または全体的な破壊によって、分子集合体に保持されていた薬物が放出されるものである（１）から（１４）までのいずれかに記載の薬物運搬体。

（１６）分子集合体が小胞体構造を有するものである（１）から（１５）までのいずれかに記載の薬物運搬体。

（１７）両親媒性分子の遊離に伴う小胞体構造の一部または全体的な破壊によって、小胞体内水相に保持されていた薬物が放出されるものである（１６）記載の薬物運搬体。

本発明によれば、その目的に応じて運搬する薬物の体内動態を制御することができる薬物運搬体が提供される。

図面の簡単な説明

図１Ａは、本発明の薬物運搬体に用いる両親媒性分子のモデル構造を示した図である。

図１Ｂは、本発明の薬物運搬体に用いる両親媒性分子のモデル構造を示した図である。

図２は、PEG脂質の小胞体からの脱離挙動を比較したグラフである。

図３は、蛋白質担持リポソームからの蛋白質結合膜貫通型脂質の脱離挙動を比較したグラフである。

図４は、還元剤添加による蛋白質結合リポソームからの蛋白質の脱離挙動を比較したグラフである。

図５は、糖脂質のアルキル鎖数の相違による糖脂質のCMC測定結果を示したグラフである。

図６は、蛋白質の相違による蛋白質結合リポソームからの蛋白質結合膜脂質の脱離速度を比較したグラフである。

図７は、蛋白質分子量の相違による蛋白質結合リポソームからの蛋白質結合糖脂質の脱離速度を比較したグラフである。

図８は、pH 応答性リポソームの低 pH による加水分解後の薄層クロマトグラフィ検出結果を示した図である。

図９は、pH 応答性リポソーム中に内包された蛍光分子の pH 変化による放出挙動を示したグラフである。

図１０は、pH 応答性リポソーム中に内包された蛍光分子の各 pH における経時的な放出挙動を示したグラフである。

図１１は、pH 応答性リポソーム中に内包された蛍光分子の pH 変化による放出挙動を示したグラフである。

図１２は、ジスルフィド脂質を含むリポソーム中に内包されたカルセインの還元剤添加による放出挙動を示したグラフである。

図１３は、種々の MP-Glu2C18 導入率のリポソーム分散液に対して Con A 溶液を添加した際の分散液の濁度(O.P.値、λ=600 nm)の経時変化を示したグラフである。

図１４は、図１３の 0.5 分後、5 分後の濁度(O.P.値、λ=600 nm)変化を MP-Glu2C18 導入率に対してプロットしたグラフである。

図１５は、2mol%MP-Glu2C18 導入リポソームに 1 mol%PEG 脂質(P125-2C14)を導入した系を、希釈倍率を変化させて希釈し、この系に Con A 溶液を添加した際の分散液の濁度(O.P.値、λ=600 nm)の経時変化を示したグラフである。

図１６は、H12-vesicle が活性化血小板と特異的に結合すること、並びに H12-vesicle に PEG を導入することにより結合が抑制されることを示したグラフである。

図１７は、 PEG(H12)-vesicle の PEG 脱離に伴う活性化血小板への結合率を比較したグラフである。

発明を実施するための最良の形態

本発明者らの分子集合科学に基づいた研究知見によれば、すべての分子集合体の構成分子は集合体と水相との間で平衡状態をとっており、リン脂質の場合には

その平衡は極めて集合体側に傾いている。しかし、親水性の高いポリエチレングリコール結合脂質、疎水性の低い一本鎖の脂肪酸、あるいはリン脂質のリゾ体などはより多くの分子が水相に遊離している状態で平衡となっている。そして、両親媒性分子の親水性－疎水性バランスの変化によってその両親媒性分子の遊離状態が制御される現象は、この平衡論に基づいて理解されている。例えば、分子集合体の水性分散液において、分子集合体が濃厚な状態では、遊離させたい両親媒性分子の平衡は集合体に傾いている。これを希釈すると、平衡状態は水相への遊離状態に傾き、遊離させたい両親媒性分子は遊離して新たな平衡状態に達する。また、平衡状態は温度の関数であるため、温度を上昇させると両親媒性分子は遊離して新たな平衡状態に達する。この様な物理的な因子で遊離を制御することができる。また、化学的な因子としては、両親媒性分子の疎水部や疎水部と親水部との結合部位を化学的に切断して疎水部を小さくすることによって、親水性－疎水性のバランスが親水性側に傾き、遊離を促進させることができる。切断される化学結合としては、加水分解性のエステル結合、アミド結合、ウレタン結合またはシッフ塩基等、または還元剤にて切断されるジスルフィド結合などが利用できる。

具体的に、本発明者らは、親水性－疎水性バランスを調節できる両親媒性分子として、大きな親水部を持つポリエチレングリコール型脂質、例えばジアシルホスファチジルエタノールアミンのアミノ基にポリエチレングリコールを共有結合させた脂質、グリセロールのジアシル誘導体の水酸基にポリエチレングリコールを共有結合させた脂質、三官能性アミノ酸(グルタミン酸やリジン)のジアルキル誘導体のカルボキシル基やアミノ基にポリエチレングリコールを共有結合させた脂質などの、いわゆる大きな親水部に対してそれを二分子膜に安定固定させるための大きな疎水部を持つ必要性から分子設計を行い、多アシル型脂質の発明に至っている (特許第 3181276 号)。本発明者らは、これらの両親媒性分子を用いて、親水性－疎水性バランスが両親媒性分子の遊離速度に及ぼす影響を解析し、大きな疎水部を有する両親媒性分子のリポソームへの固定と遊離に関して、本発明の基礎となる多くの知見を集積し、さらに遊離を促進する物理的因子、化学的因子を整理した。

また、本発明者は、ポリエチレングリコール型脂質の固定とは逆の発想で、この脂質の遊離によって、むしろ効果的に外部刺激に応じた薬物の体内動態が制御できるという発想に至った。

以下、本発明の薬物運搬体についてより具体的に説明する。

まず、本発明の薬物運搬体に用いられる分子集合体について述べる。本発明の薬物運搬体に用いられる分子集合体は、薬物を担持させることができるものであれば特に限定されない。そのような分子集合体としては、例えば、高分子集合体、高分子ミセル、エマルジョン、リピドマイクロスフィア、二分子膜小胞体(リポソーム)、その他分子集合体(チューブ、ファイバー、リボン、シート等)を用いることができる。この分子集合体の構成成分としては、外部環境の変化によって分子集合体から遊離しうる両親媒性分子と、この遊離性両親媒性分子と分子集合体を形成する性質がある高分子とが含まれる。分子集合体を形成する高分子としては、遊離性の両親媒性分子と分子集合体を形成する性質があるものであれば特に限定されず、合成または天然の高分子を使用することができる。合成高分子としては、例えば、両親媒性のブロック共重合体または多糖類などの親水性の主鎖に疎水性の置換基を持つくし型高分子、あるいは両親媒性の膜タンパク質などが挙げられる。これらの高分子が形成する分子集合体の形状は高分子ミセルが一般的であるが、小胞体状またはファイバー状、チューブ状、シート状のものであってもよい。あるいは、ポリ[N-2(ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド](PHPMA)またはポリ[N-(イソプロピル)アクリルアミド]（PNIPAM）などの温度応答性のビニル系ポリマーなどが転移温度以上で形成する凝集体も分子集合体の構成成分として使用できる。

水と混じり合わないトリグリセリドなどの油滴をリン脂質などの界面活性剤などで安定化させたo/wエマルジョンやリピドマイクロスフェアは、脂溶性の薬物の安定分散に多用される。この場合、薬物としては、特に限定されるものではないが、例えばドキソルビシン誘導体またはパクリタキセルまたはメトトレキセートなどを用いることができる。

薬物運搬体として汎用されるリン脂質小胞体あるいはリポソームは、脂質及び/又はリポタンパク質によって、水性媒質中で分子間相互作用(疎水性相互作用、

静電的相互作用、水素結合など)することにより、共有結合を介さずに構成された膜を持つ小胞構造の分子集合体であり、その膜は単層（一枚の二分子膜）又は多重層(ラメラ)膜を形成するものである。そのサイズは数十ナノメートルから数十マイクロメートルのものがあるが、好ましくは 10 ナノメートルから 1 マイクロメートル、より好ましくは 30 ナノメートルから 300 ナノメートルである。その他、二分子膜のシート状、リボン状、チューブ状またはファイバー状などの集合形態があり、これらも本発明でいう分子集合体に含まれる。

小胞体構造を有する分子集合体は、小胞体の内水相または二分子膜に水溶性や脂溶性の薬物を保持させることができ、これにより血中滞留時間を延長させることができるので好ましい。小胞体構造を有するものの中でも、特にリン脂質小胞体あるいはリポソームが好ましい。

リン脂質小胞体あるいはリポソームは薬物運搬体の領域で開発が進んでおり、リン脂質単独、あるいはリン脂質とコレステロール及び/又は脂肪酸との混合脂質によって構成される。

リン脂質としては、卵黄レシチン、大豆レシチン、水添卵黄レシチン、水添大豆レシチン、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴミエリン、多種の糖脂質などが挙げられる。これらのリン脂質は、エン(二重結合)、イン(三重結合)、ジエン、ジイン、トリエンなどの不飽和部を含有しても良いし、ビニル基などの重合性基、例えばスチリル基を含有しても良い。重合性リン脂質の具体例としては、1,2-ジ(オクタデカ-trans-2,trans-4-ジエノイル)ホスファチジルコリン、1,2-ジ(オクタデカ-2,4-ジエノイル)ホスファチジン酸、1,2-ビスエレオステアロイルホスファチジルコリンなどが挙げられる。リン脂質の含有量は分子集合体の構成脂質の全モル数に対し、5～70 モル%であることが好ましく、20～50 モル%であることがより好ましい。

アシル鎖を構成する脂肪酸としては、炭素数 12～20 の飽和または不飽和脂肪酸が用いられる。例えば、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、オクタデカ-2,4-ジエン酸などがある。更には、グリセロール骨格ではなく、3 官能性アミノ酸、例えばグルタミン酸やリジン骨格を持つ両イオン性などのアミノ酸型脂質も使用することができる。脂肪酸の含

有量は分子集合体の構成脂質の全モル数に対し、1～70 モル%であることが好ましく、5～30 モル%であることがより好ましい。

分子集合体には、負電荷脂質を成分として添加することもできる。膜成分中に負電荷脂質を混合させることで小胞体同士の凝集が抑制され、被覆層数が減少して内包効率を増大させることができるからである。負電荷脂質としては、ジアシルホスファチジルグリセロール、ジアシルホスファチジン酸、ジアシルホスファチジルイノシトール、ジアシルホスファチジルセリン、アニオン性アミノ酸型脂質などが使用できる。負電荷脂質の含有量は分子集合体の構成脂質の全モル数に対し、1～70 モル%であることが好ましく、5～30 モル%であることが特に好ましい。

また、分子集合体には、脂質小胞体の膜成分としてステロール類を安定化剤として添加してもよい。そのようなステロール類としては、例えば、エルゴステロール、コレステロール等、ペルヒドロシクロペンタノフェナントレンを有する全てのステロイドが挙げられるが、好ましくはコレステロールである。ステロール類の含有量に制限はないが、小胞体膜の安定性を考慮すれば、分子集合体の構成脂質の全モル数に対し、5～50 モル%であることが好ましく、より好ましくは 15～40 モル%である。

本発明において、分子集合体には、外部環境の変化によって分子集合体から遊離しうる両親媒性分子が含まれる。当該両親媒性分子の含有量は、標的となる臓器・組織、薬物の種類、薬物の担持部位、担持方法、分子集合体の形態等に応じて適宜決定されるものであり、特に制限はないが、例えば、分子集合体の構成脂質の全モル数に対し、0.01～100 モル%であることが好ましく、0.05～50 モル%であることがより好ましく、0.1～30 モル%であることが特に好ましい。

分子集合体の製造方法は特に限定されるものではなく、一般に公知の方法を用いることができる。例えば、リポソームの製造の手法としては、単独または混合脂質の粉末もしくは薄膜を水和させ分散させた後、高圧押出し(エクストルージョン)法、超音波照射法、撹拌(ボルテックスミキシング、ホモジナイザー)法、凍結融解法、マイクロフルイダイザー法などで製造する方法、単独または混合脂質を有機溶媒に溶解させた溶液を水相に注入した後、エタノールやエーテルなど

の有機溶媒を減圧または透析で除去して形成する方法、あるいは、単独または混合脂質をコール酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム、TritonX またはラウリルエーテルなどの非イオン性界面活性剤と共に水相に分散させてエマルジョンを形成させ、透析によって除去して形成する方法、その他、逆相蒸発法、インキュベーション法などを採用することができる。

このような分子集合体に薬物を担持させる方法は、薬物の種類等に応じて適宜選択すればよい。水溶性薬剤の場合には、例えば、リポソーム製造時に薬剤を水相に溶解させて調製することができる。あるいは、リポソームを製造した後に外水相に水溶性薬剤を添加し、リポソーム膜の透過性を利用して、内水相に薬剤を導入させることができる。内包されなかった水溶性薬剤はゲルろ過、超遠心分離または限外ろ過膜処理などにより内包小胞体と分離できる。脂溶性薬剤の場合には、例えば、単独または混合脂質が有機溶媒に溶けている状態で薬剤を混合して、上述した方法でリポソームを形成させることにより、二分子膜の疎水部に薬物を導入することができる。また、官能基をもった両親媒性分子を含有するリポソームを形成させた後に、リポソーム表面に露出している官能基に、水相での化学反応を用いて薬物を担持させることもできる。あるいは、あらかじめリポソームを製造した後、水と混じり合う有機溶媒に薬剤を溶解させ、これを外水相に添加して薬剤を二分子膜の疎水部に導入させることができる。

次に、本発明の薬物運搬体の具体的態様について述べる。

本発明においては、分子集合体の外部環境の変化によって、分子集合体を構成する一部の両親媒性分子が分子集合体から遊離する現象を利用する。本発明の薬物運搬体は、この両親媒性分子の遊離現象によって、生体内における薬物動態を制御するものである。「外部環境」とは、分子集合体をとりまく環境を意味し、温度、pH、分子集合体の希釈度、イオン環境、還元的雰囲気などが挙げられる。

分子集合体から遊離する両親媒性分子は、その分子内の親水部－疎水部バランスによって分子集合体からの遊離速度を制御することが可能である。遊離速度は、標的となる臓器・組織、薬物の種類、薬物の担持部位、担持方法、分子集合体の形態等に応じて適宜調節することができる。例えば、親水部に対し疎水部の比率が大きくなるように設計することにより、遊離速度を低下させることができる。

逆に、疎水部に対し親水部の比率を大きくすることにより遊離速度を増大させることができる。

本発明の薬物運搬体は、分子集合体から一部の両親媒性分子が遊離することによって薬物動態を制御できるものであれば特に限定されない。本発明の薬物運搬体は、遊離する両親媒性分子の親水部、疎水部、薬物及び親水性高分子の組み合わせ並びに制御法により、例えば次の４つの態様が挙げられる。

本発明の第１の態様は、遊離する両親媒性分子の親水部あるいは疎水部に薬物を担持させることによって薬物動態を制御する態様である（図１A(a)）。本発明の第２の態様は、遊離する両親媒性分子の親水部に、親水性高分子、又は認識部位が結合した親水性高分子を担持させることによって薬物動態を制御する態様である（図１A(b)）。本発明の第３の態様は、両親媒性分子が分子集合体から遊離してリポソーム等のキャリアー表面の認識部位が発現することによって薬物動態を制御する態様である（アクティブターゲティング、図１A(c)）。本発明の第４の態様は、遊離する両親媒性分子が特に膜貫通型の構造を有することによって薬物動態を制御する態様である（図１B(d)）。以下、各態様について説明する。

（第１の態様）

本発明の第１の態様の薬物運搬体は、遊離する両親媒性分子が薬物、親水部及び疎水部から構成されており、遊離する両親媒性分子に薬物を担持させることによって薬物動態を制御するというものである（図１A(a)）。本態様における分子集合体から遊離する薬物を結合させた両親媒性分子（以下「薬物結合両親媒性分子」ということがある。）の構造としては、両親媒性分子１および２：

(薬物)－(結合部位Ａ)－(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)　　１

(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)－(結合部位Ｃ)－(薬物)　　２

[式中、結合部位Ａは親水部と薬物とを結合する部位であり、結合部位Ｂは親水部と疎水部とを結合する部位であり、結合部位Ｃは疎水部と薬物とを結合する部

位である]が挙げられる。

(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)は、リン脂質、スフィンゴ脂質、またはアミノ酸型脂質などとして知られる公知の全ての両親媒性分子を対象とすることができる。親水部には、通常の両親媒性分子の親水部として用いられるものの他、ポリエチレングリコール、多糖類、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリグルタミン酸、ポリペプチドなどの親水性の高分子を含有する場合もある。

結合部位Ｂは、親水部と疎水部とを結合する部位であり、両親媒性分子において通常このような機能をもつものとして知られているものであれば特に限定されない。結合部位Ｂは、グリセロール、オリゴ糖類、オリゴペプチド類、ポリエステル類、ビニル系オリゴマー、グルタミン酸またはリジンなどのアミノ酸、あるいはこれらから構成される多分岐構造、たとえばデンドロン構造などを介して、一つの親水部と一つまたは二つ以上の疎水部とを結合している。これらの中でも、結合部位Ｂは、オリゴ糖鎖、オリゴペプチド鎖、ポリエステル鎖、ビニル系オリゴマーおよびデンドロン構造からなる群から選択される少なくとも１種であることが好ましい。例えば、グリシンユニットをスペーサーとしたグルタミン酸の繰返しからなるオリゴペプチド鎖は、側鎖にカルボン酸基を任意の数だけもっており、そこに疎水部をアミド結合またはエステル結合にて任意の数だけ導入することができ、親水部はオリゴペプチド鎖のＮ末端に結合できる。あるいは、オリゴアクリル酸またはオリゴビニルアルコールのカルボン酸基またはヒドロキシル基に疎水部を高分子反応にて結合させることができる。例えば、イニファーター重合にてこれらのオリゴマーを重合させた場合、分子量を制御するとともに、末端に官能基を導入させることができるため、この末端に親水部を結合させることができる。あるいは、グルタミン酸またはリジンからなるモノデンドロンでは、末端の官能基の数を世代数にて制御できる。第一世代では２個、第二世代では４個、第三世代では８個となる。ここに疎水部を結合させることによって疎水部の数を制御することができる。親水部はモノデンドロンの逆側に１個ある官能基に結合させることができる。

疎水部は、両親媒性分子に十分な疎水性を付与できるものであれば特に限定さ

れない。例えば、疎水部としては、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、飽和高級アルコール、不飽和高級アルコール、ステロイド類などが使用される。これらは直鎖であってもよく分岐鎖であってもよい。

本発明においては、遊離する両親媒性分子の疎水部が２本以上の炭化水素鎖を有することが好ましい。ここでいう「疎水部が２本以上の炭化水素鎖を有する」とは、結合部位Ｂに炭化水素鎖が２本以上結合する場合をいう。炭化水素鎖は分岐鎖であってもよく、分岐鎖としては、例えば、長鎖にイソプレノイド構造を持つものが挙げられる。

炭化水素鎖の数は特に限定されないが、２本以上が好ましい。炭化水素鎖の数には上限は特に設定されないが、合成が容易である点で通常は１８本以下であることが好ましい。

疎水部に導入される炭化水素鎖としては、アルキル鎖、アルケニル鎖またはアルキニル鎖が好ましく、立体障害を最小にすることができ分子集合体に導入しやすいことから、特にアルキル鎖が好ましい。これらの炭化水素鎖は、両親媒性分子の疎水部として十分な疎水性を示し、かつ、分子集合体への導入を阻害しない範囲であれば、置換基を有していてもよい。また、炭化水素鎖は、酸素原子、硫黄原子、－ＮＲ－（ただし、Ｒは置換基を有していてもよいアルキル基、アルケニル基またはアルキニル基を表す。）等で、中断されていてもよい。炭化水素鎖の炭素数は特に限定されるものではないが、４～２４が好ましく、１０～２０がより好ましく、１２～１８が特に好ましい。なお、結合部位Ｂとしてグルタミン酸またはリジンを含む場合には、これらの持つ２個のカルボン酸基または２個のアミノ基に、上記の疎水部を結合させることもできる。

具体的に、(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)で表される両親媒性分子としては、ポリエチレングリコール脂質、糖脂質、ペプチド結合脂質、蛋白質(抗体、酵素等)結合脂質、核酸等薬物結合両親媒性分子、多アシル鎖型脂質、膜貫通型脂質などが採用できる。ポリエチレングリコール脂質の例としては、分子量 200 Da から 12500 Da 程度、好ましくは 1000 Da から 5000 Da 程度の片末端、あるいは両末端にアミノ基、カルボキシル基、水酸基、マレイミド基等の置換基を持つポリエチレングリコール、エチレングリコールとプロピレングリコールとの共重

合体などが挙げられ、またそれらの末端置換基を活性化した誘導体も含まれる。糖脂質は還元性末端基を有するもので、分岐または直鎖の糖重合度が 2～400 のオリゴ糖や多糖であればよく、天然糖または合成糖のいずれでも良い。オリゴ糖は、例えば、グルコース、フルクトース、キシロース、ガラクース、マンノース、グルコサミン等の一種又は二種以上がα結合またはβ結合した糖であり、例えば、マルトオリゴ糖、ラミナリオリゴ糖、セロオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖、ゲンチオオリゴ糖、ニゲロオリゴ糖、ラクトオリゴ糖、メリオリゴ糖、イヌロオリゴ糖などが挙げられる。多糖類では、デンプン、セルロース、ムコ多糖類(ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、デルマンタン硫酸、ケタラン硫酸、ヘパリン等)、キチン、キトサン、その他多糖類の分解物、細胞、細菌由来の複合糖質等が挙げられる。

本態様において、薬物は、結合部位Ａによって親水部に結合された式１で表される両親媒性分子１、または、結合部位Ｃによって疎水部末端に結合された式２で表される両親媒性分子２によって分子集合体に共集合により導入される。結合部位Ａ、Ｃは、それぞれ薬物を親水部または疎水部と結合する部位である。結合部位Ａ、Ｃとしては、アミド結合、エステル結合、エーテル結合、ウレタン結合、ジスルフィド結合、メルカプト基とマレイミド基とが付加した結合などが挙げられる。

本発明の薬物運搬体に担持させることのできる薬物は、少なくとも標的となる臓器または組織の一つに作用するものであれば特に限定されない。そのような薬物としては、例えば、酵素、ペプチド又はタンパク質、各種抗生物質、各種ペプチド性ホルモン、DNA、RNA、siRNA、プラスミド、各種抗がん剤、中枢神経系用薬、末梢神経用剤、感覚器官用薬、循環器官用薬、呼吸器官用薬、消化器官用薬、ホルモン剤、泌尿生殖器官および肛門用薬、外皮用薬、歯科口腔用剤、ビタミン剤、滋養強壮薬、血液および体液用薬、人工透析用薬、その他の代謝性医薬品、細胞賦活用剤、腫瘍用薬、放射性医薬品、アレルギー用薬、生薬および漢方処方に基づく医薬品、抗生物質製剤、化学療法剤、生物学的製剤、診断用薬などがある。ペプチドまたはタンパク質の一例としては、インターロイキン等の各種サイトカイン、細胞伝達因子、フィブリノーゲン、コラーゲン、ケラチン、プロ

テオグルカン等細胞外マトリックス剤としてのポリペプチドまたはその構造の一部としてのオリゴ体、あるいはオキシトシン、ブラジキニン、チロトロビン放出因子、エンケファリン等の機能性ポリペプチドが挙げられる。酵素としては、カタラーゼ、キモトリプシン、チトクローム、アミラーゼなどが挙げられるが、これらに何ら限定されるものではない。これらの薬物は、１種単独で用いてもよく、２種以上を組み合わせて用いることもできる。

この分子集合体を、例えば、血中に投与すると、分子集合体が希釈されることによって、リポソームに担持された薬物結合両親媒性分子が遊離する。遊離した薬物結合両親媒性分子は、血流に乗って循環し、吸収・代謝・排泄される。このため、薬物結合両親媒性分子は平衡に達することなく分子集合体から一方的に遊離する。遊離速度は、薬物結合両親媒性分子の親水性－疎水性バランスが親水性側に傾いた両親媒性分子ほど速い。この遊離速度は、親水部における親水性高分子の分子量または電荷量、あるいは疎水部におけるアルキル長鎖などの炭化水素鎖の長さまたは本数によって制御することができる。

両親媒性分子１または２の親水性－疎水性バランスは、薬物の種類、標的となる臓器または組織、病態、両親媒性分子１または２自体の動態などに応じて適宜設計すればよい。この様な両親媒性分子１または２は、上述した方法により分子集合体、例えばリン脂質からなるリポソームの二分子膜に導入することができる。

第１の態様において、両親媒性分子１および２の含有量は、薬物の種類、標的となる臓器または組織、病態などに応じて適宜決定されるものではあるが、それぞれ、分子集合体の構成脂質の全モル数に対し、0.01～30 モル％であることが好ましく、0.1～10 モル％であることが特に好ましい。

（第２の態様）

本発明の第２の態様の薬物運搬体は、遊離する両親媒性分子の親水部に、親水性高分子、又は認識部位が結合した親水性高分子を担持させることによって薬物動態を制御するというものである（図１Ａ(ｂ)）。本発明の第２の態様の薬物運搬体は、第１の態様の「薬物」の部分が「親水性高分子」となっており、基本的に親水性高分子、親水部及び疎水部を含むものである。また、本態様には、親水性高分子に、さらに認識部位が結合されたものも含まれる。

本態様における分子集合体から遊離する両親媒性分子の構造としては、分子内に親水性高分子が結合した両親媒性分子３および４：

(親水性高分子)－(結合部位Ｄ)－(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)　　３

(認識部位)－(結合部位Ｅ)－(親水性高分子)－(結合部位Ｄ)－(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)　　４

[式中、結合部位Ｂは親水部と疎水部とを結合する部位であり、結合部位Ｄは親水性高分子と親水部とを結合する部位であり、結合部位Ｅは認識部位と親水性高分子とを結合する部位である]が挙げられる。

式３または４で表される両親媒性分子は、例えばリン脂質と共集合させることにより、リポソームの表面を親水性高分子によって修飾することができるものである。親水性高分子としては、第１の態様の親水部の説明で記載したものと同じものを使用できる。親水性高分子の分子量は200 Daから20000 Da程度であることが好ましく、2000 Daから12500 Da程度であることが特に好ましい。親水性高分子がポリエチレングリコール鎖であれば、修飾していないリポソームと比較してリポソームの血中滞留時間を大幅に延長させる効果がある。また、親水性高分子自体を、臓器または組織を構成する細胞に認識されやすい多糖類とすることにより、その臓器または組織に対する特異性を高めることができる。特に、両親媒性分子４は、例えば表面修飾ポリエチレングリコール鎖などの親水性高分子の末端にオリゴペプチド鎖または糖鎖などの認識部位を有しており、薬物運搬体の体内動態を制御することができる。

本発明では、両親媒性分子３または４が外部環境の変化で遊離することによって、薬物運搬体の体内動態をより精度よく制御することができる。例えば、リポソームを修飾しているポリエチレングリコール結合脂質がリポソームの血中滞留時間を増大させているが、これがリポソームから遊離することによって、血中滞留時間を短くすることができる。遊離する速度は、ポリエチレングリコールの分子量または疎水部の大きさによって調節できる。また、両親媒性分子４を導入し

たリポソームでは、両親媒性分子４を認識する臓器または組織を構成する細胞への特異的な集積性を高めることができるが、両親媒性分子４の遊離によって特異性が低下して、さらに遊離した両親媒性分子４がその被認識部位に結合して、両親媒性分子４が修飾されているリポソームの認識を阻害するのでより特異性が低下する。更には、両親媒性分子３および４を混合してリポソーム表面に導入し、更にそれらの遊離速度を各々制御することによってより精度高く薬物運搬体の体内動態を制御することができる。

結合部位ＤまたはＥは、それぞれ親水性高分子と親水部との結合、あるいは親水性高分子と認識部位との結合であれば特に限定されない。そのような結合部位ＤまたはＥとしては、例えば、アミド結合、エステル結合、エーテル結合、ウレタン結合、ジスルフィド結合、メルカプト基とマレイミド基との縮合結合やアルデヒド基とアミノ基とのシッフ塩基などが挙げられる。

認識部位としては、標的となる臓器または組織を特異的に認識するものであれば特に限定されない。認識部位の一例としては、上記記載のオリゴ糖、抗体、ペプチドホルモン、レクチン、糖タンパク等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

第２の態様において、両親媒性分子３および４の含有量は、所望の血中対流時間や認識能に応じて適宜決定されるものではあるが、それぞれ、分子集合体の構成脂質の全モル数に対し、0.01～50 モル％であることが好ましく、0.1～20 モル％であることが特に好ましい。

（第３の態様）

本発明の第３の態様の薬物運搬体は、分子集合体を構成する一部の両親媒性分子が遊離することによって分子集合体表面の認識部位が発現し、それにより薬物動態を制御するというものである（図１Ａ(ｃ)）。本態様の薬物運搬体としては、例えば、両親媒性分子５が担持されている分子集合体であって、該分子集合体に導入されている両親媒性分子３が両親媒性分子５の認識を阻害する状態にあって、両親媒性分子３の遊離によって両親媒性分子５の認識能が発現されることで薬物動態が制御される薬物運搬体が挙げられる。

本態様において、両親媒性分子５および３：

(認識部位)－(結合部位Ｅ)－(親水部)―(結合部位Ｂ)－(疎水部)　5

(親水性高分子)－(結合部位Ｄ)－(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)　3

[式中、結合部位Ｂおよび結合部位Ｄは前記と同じ意味であり、結合部位Ｅは認識部位と親水部とを結合する部位である。]を共に分子集合体の表面に共集合させる場合、両親媒性分子３の親水性高分子は、両親媒性分子５の認識部位よりも分子量が大きい親水性高分子であることが好ましい。このような組み合わせで両親媒性分子を用いることにより、親水性高分子によって分子集合体表面の認識部位を、臓器または組織の細胞による認識から阻害することができる。この状態で分子集合体を血中に投与すると希釈効果等の外部環境の変化によって両親媒性分子３が遊離する。これに伴って、両親媒性分子５の認識部位がリポソームの表面に露出するとその認識部位によって臓器または組織を構成する細胞への特異的な集積性が高まるため、薬物運搬体の体内動態を制御することができる。さらに、両親媒性分子５が遊離することによって特異的な集積性が低下し、これによっても薬物運搬体の体内動態を制御できる。両親媒性分子５の有する認識部位としては、第２の態様で述べたものと同じものを例示することができる。

例えば、両親媒性分子５としては、グルタミン酸またはリジンなどの親水部の末端にオリゴペプチド鎖または糖鎖などの認識部位を有するものが挙げられる。特に糖鎖は糖結合タンパク質であるレクチンによって構造特異的に認識されることから、糖鎖を認識部位として有する両親媒性分子５を含む分子集合体は、細胞膜表面上のタンパク質や糖鎖などのリガンドやレセプターを特異的に認識するキャリアとして利用することができ、有用性が高い。

両親媒性分子３としては、第２の態様において述べたものと同じものを例示することができる。本態様では、両親媒性分子３の有するポリエチレングリコール鎖などの親水性高分子によって、両親媒性分子５の認識能が阻害される。両親媒性分子３における親水性高分子は、両親媒性分子５の認識能を阻害できるものであれば特に制限されないが、分子量が 200 Da から 20000 Da 程度であることが好

ましく、2000 Daから12500 Da程度であることが特に好ましい。

第３の態様において、両親媒性分子５の含有量は、所望の認識能に応じて適宜決定されるものではあるが、分子集合体の構成脂質の全モル数に対し、0.01～50モル％であることが好ましく、0.1～30 モル％であることが特に好ましい。また、両親媒性分子３の含有量は、両親媒性分子５の認識能を阻害できる範囲であれば制限はないが、分子集合体の構成脂質の全モル数に対し、0.01～30 モル％であることが好ましく、0.05～10モル％であることが特に好ましい。

なお、両親媒性分子３の遊離速度は、親水性高分子の分子量または電荷量あるいは疎水部の大きさによって制御することができる。両親媒性分子５の遊離速度についても同様の方法で制御することができる。従って、これらの両親媒性分子の相対的な遊離速度は目的に応じて適宜設計することができる。

（第４の態様）

本発明の第４の態様は、分子集合体の膜を貫通する膜貫通型両親媒性分子が遊離することによって、薬物運搬体の体内動態を制御するというものである（図１Ｂ(ｄ)）。上述した第１～３の態様で例示した両親媒性分子の構造は、遊離する両親媒性分子が、簡単には親水部－疎水部で示される構造で分類されるものであるが、本発明に用いられる両親媒性分子は親水部－疎水部－親水部で示される構造で分類されるものであっても良い。本態様においては、このような構造を有する両親媒性分子が好ましい。

本態様に用いられる両親媒性分子としては、具体的には、

(薬物)－(結合部位Ａ)－(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)―(結合部位Ｂ)－(親水部)　　6

(薬物)－(結合部位Ａ)－(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)―(結合部位Ｂ)－(親水部)－(結合部位Ａ)－(薬物)　　7

(親水性高分子)－(結合部位Ｄ)－(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)―(結合部位Ｂ)－(親水部)　　8

(親水性高分子)－(結合部位Ｄ)－(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)―(結合部位Ｂ)－(親水部)―(結合部位Ｄ)―(親水性高分子)　９

(認識部位)－(結合部位Ｅ)－(親水性高分子)－(結合部位Ｄ)－(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)－(結合部位Ｂ)－(親水部)―(結合部位Ｄ)―(親水性高分子)　１０

(認識部位)－(結合部位Ｅ)－(親水性高分子)－(結合部位Ｄ)－(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)－(結合部位Ｂ)－(親水部)―(結合部位Ｄ)―(親水性高分子)－(結合部位Ｅ)－(認識部位)　１１

［式中、結合部位Ａ、結合部位Ｂ、結合部位Ｄおよび結合部位Ｅは前記と同じ意味である。］で表される両親媒性分子などが挙げられる。

これらの両親媒性分子は、例えば、リポソームの二分子膜において二分子膜を貫通する構造で集合体中に導入される。疎水部は一本鎖でも二本鎖以上でも構わないが、これは結合部位Ｂによって決まる。また、疎水部の長さは二分子膜を貫通できる長さであれば構わないが、炭素数では２０～５０、好ましくは２８～３６である。両親媒性分子７または９のような対称型の構造は合成が容易であるが、例えばリポソームを形成した場合にリポソームの内水相側にも親水性高分子または薬物が配向することになる。このことは遊離速度の制御、即ち薬物動態の制御として都合が良い場合もあるが、親水性高分子または薬物がリポソーム表面に露出しないため、これらが有効に機能し得ず、無駄になる場合がある。後者の場合には、リポソームに両親媒性分子を導入した後、表面に露出している両親媒性分子の末端にのみ薬物または親水性高分子を結合部位Ａまたは結合部位Ｄを介して結合させることもできる。膜貫通型両親媒性分子の場合、遊離速度の制御は親水性－疎水性バランスのほか、内水相に面している親水部の大きさや電荷量も重要な因子となる。すなわち、膜貫通型両親媒性分子の疎水性が低くても、内水相に面している親水性が強ければ膜貫通型両親媒性分子はリポソームから遊離し難くなる。

第４の態様において、両親媒性分子６～１１の含有量は特に制限されないが、それぞれ、分子集合体の構成脂質の全モル数に対し、0.01～100 モル%であることが好ましく、0.1～25 モル%であることが特に好ましい。

（両親媒性分子の遊離速度の制御方法）

両親媒性分子の分子集合体からの遊離現象は、外部環境の変化により生じる。「外部環境」とは、前述したように分子集合体をとりまく環境を意味し、外部環境としては、例えば、分子集合体を希釈するための希釈液、分子集合体の温度を変化させる周囲温度、分子集合体の pH を変化させるための周囲水素イオン濃度などが挙げられる。このように外部環境の変化としては、血中投与した際の希釈による平衡状態から非平衡状態へのシフトに限らない。平衡状態は温度によってもシフトする。例えば、温度が上昇すると平衡状態は遊離側にシフトするので、遊離を促進させることができる。さらに分子集合体の運動性にも影響を受ける。例えば、ジパルミトイルホスファチジルコリンリポソームの場合、ゲル－液晶相転移温度は 42℃にあるが、相転移温度以下の 35℃よりも相転移温度付近の 40℃や相転移温度以上の 43℃の方が膜の分子充填状態が乱れて遊離し易くなる。従って、カイロ、赤外線、マイクロウエーブまたはカテーテルなどによる局所加温によって分子集合体から両親媒性分子を局所的に遊離させることができる。あるいは酸化鉄の微粒子をリポソームに内包させて、これをマイクロウエーブで加温させることによって、当該リポソームの温度を局所的に制御できる。相転移温度は、相転移温度の異なる脂質の組合せとその組成、例えばジミリストイルフォスファチジルコリンとジパルミトイルフォスファチジルコリンの組成を変えることにより変化させることができる。また、ポリ-(N-イソプロピルアクリルアミド)(PNIPAM)などの温度応答性高分子が遊離する両親媒性分子の親水性高分子であれば、相転移温度以下では親水性が高まり遊離し易くなる。

分子集合体からの両親媒性分子の遊離速度は、例えば、プロトン、アルカリ金属イオンおよびアルカリ土類金属イオンの濃度変化を利用することにより調節することができる。例えば、親水部にアミノ基を持たせれば、低 pH でのアミノ基のプロトン化によって親水性が向上し遊離速度が大きくなる。また、親水部にカルボン酸基を持たせれば、高 pH でのカルボン酸基の解離によって親水性が向上

し遊離速度が大きくなる。

あるいは、遊離する両親媒性分子の結合部位または疎水部にエステル結合、アミド結合、ウレタン結合及びシッフ塩基からなる群から選択される少なくとも１種の結合を含有し、分子集合体からの両親媒性分子遊離現象がこれらの結合の加水分解によるものであることも好ましい。例えば、結合部位Ｂがリジンであり、そのカルボキシル基に長鎖アルコールをエステル結合させて疎水部を導入し、更にはアミノ基には長鎖脂肪酸をアミド結合させて疎水部を導入した両親媒性分子、または結合部位が 2-アミノペンタン二酸などのジカルボン酸誘導体であり、そのカルボキシル基に長鎖アルコールをエステル結合させて疎水部を導入した両親媒性分子、あるいはグリセロールに脂肪酸をエステル結合させて疎水部を導入した両親媒性分子は、pH の低下によって加水分解が起こり、その結合が解離することによって両親媒性分子の親水性－疎水性バランスが大きく親水性側に傾き、分解された両親媒性分子の遊離が起こる。この遊離によってリポソームの二分子膜の分子充填状態が大きく乱れ、内包された薬物の放出が促進されるので、薬物運搬体の体内動態を制御することができる。この体内動態は、血流または臓器、組織のみならず細胞内をも含めることができ、pH 変化に応答して両親媒性分子を遊離する系は細胞内での動態制御にも用いられる。

また、親水部にリン酸基を持つ両親媒性分子は、カルシウムイオンなどの２価のカチオンと結合し、親水性－疎水性バランスが疎水性側に傾き、その遊離速度が低下する。本発明においてはこの現象も利用することができる。更には、クエン酸などのキレート剤によってこのカルシウムイオンを捕捉することによって、抑制されていた遊離速度を促進させることもできる。一般に、解離基を親水部にもち、これによって親水性－疎水性バランスが制御されている両親媒性分子では、水相のイオン強度の増大に伴って電荷遮蔽が起こるため、このバランスは疎水性側に移動して遊離速度が減少する。

遊離する両親媒性分子の結合部位Ｂまたは疎水部にジスルフィド結合を含有し、分子集合体からの両親媒性分子の遊離現象が、ジスルフィド結合の還元による切断であることも好ましい。このような両親媒性分子としては、例えば、システインのアミノ基に脂肪酸をアミド結合にて導入し、もう一つの疎水部をアルカンチ

オールのジスルフィド結合にてシステインのメルカプト基に導入し、カルボン酸基には親水部を導入させたものが挙げられる。あるいは、疎水部のアルキル鎖にジスルフィド基を導入させる方法も有効である。これは上記の両親媒性分子６から１１までの膜貫通型両親媒性分子の疎水部に導入する場合も含まれる。ジスルフィド基は複数導入することができる。結合部位に導入する場合は、結合部位Ｂに導入するのが好ましい。

これらのジスルフィド基は、生体内または細胞内の還元作用、例えばシステインまたはグルタチオンなどによる還元によって切断されると、両親媒性分子の親水性－疎水性バランスが親水性側に傾き、切断された両親媒性分子が遊離する。本発明はこの現象を利用するものである。

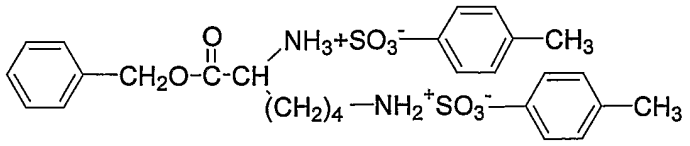
その他、外部環境の変化による両親媒性分子の分子集合体からの遊離を促進する方法としては、ずり応力、振動、光反応、ラジカル反応、活性酸素による過酸化反応、生体由来の界面活性作用などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

以下に実施例を挙げて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。

〔実施例１〕

本実施例では、リジンをスペーサー（結合部位Ｂに相当する）として親水部にポリエチレングリコール(PEG)、疎水部に 2 本のアルキル基を有する化合物を合成した。

(A) まず、リジンのカルボキシル基に保護基を以下のようにして導入した。すなわち、L-リジン(5.1 g、35.2 mmol)、p-トルエンスルホン酸(14.7 g、77.3 mmol)およびベンジルアルコール(14.0 g、124.1 mmol)を溶媒ベンゼン(30 mL)に溶解させ、生成水を除去しながら、100℃で 6 時間還流させた。溶媒を減圧除去した後、残分に対し、ジエチルエーテルにて再沈殿精製を 3 回行った。この精製した生成物をメタノール/ジエチルエーテルの混合溶媒から 4℃で再結晶し、濾過し、乾燥してカルボキシル基をベンジルエステルで保護したリジン誘導体 1（化合物 1）を白色固体として得た(18.0 g、収率 88 %)。



化合物 1

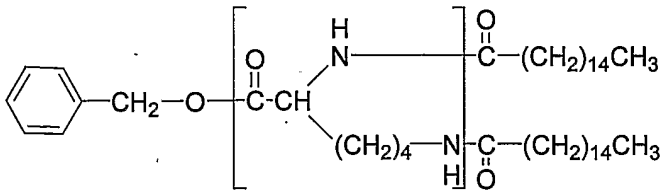
リジン誘導体 1 の分析結果：

薄層クロマトグラフィー(シリカゲルプレート、クロロホルム/メタノール(4/1)(容量/容量)：Rf：0.2 (モノスポット)。

赤外吸収スペクトル(cm^{-1})：3034；2952 [ν_{N-H} (NH_3^+)]；1749 [$\nu_{C=O}$ (エステル)]；1600 [δ_{N-H} (NH_3^+)]。

^{1}H-NMR スペクトル(DMSO-d6 , 500 MHz , δ(ppm))：1.28 , 1.40 (m, 2H, lys β-CH_2)；1.51 (m, 2H, lys γ-CH_2)；1.80 (m, 2H, lys δ-CH_2)；2.29 (s, 6H, -CH_3)；2.70 (m, 2H, lys ε-CH_2)；4.09 (s, 1H, lys α-CH_2)；5.25 (s, 2H, -CH_2)；7.12 , 7.48 (8H, p-Tos-aroma.)；7.35-7.42 (5H, aroma.)；7.67 , 8.38 (s, 6H, -NH_3^+)。

(B) リジン誘導体 1 のアミノ基に疎水性基としてアルキル基を以下のようにして導入した。すなわち、パルミチン酸(3.2 g、12.4 mmol)と N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(2.6 g、12.4 mmol)を溶媒クロロホルムに溶解させ 25℃で 30 分間撹拌した後、リジン誘導体 1 (3.0 g、5.12 mmol)とトリエチルアミン(1.2 g、11.4 mmol)を添加した。この反応混合物を 4℃で 12 時間撹拌し、グラスフィルター(G4)で濾過した後、溶媒を減圧除去した。残分をクロロホルム(100 mL)に再溶解させ、炭酸ナトリウム飽和水溶液で 3 回、水で 3 回洗浄した。クロロホルム層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、溶媒を減圧除去した。メタノール(200 mL)から 4℃で再結晶し、濾過後、乾燥して各アミノ基にそれぞれアルキル基をアミド結合させたリジン誘導体 2（化合物 2）を白色固体として得た(2.9 g、収率 79 %)。



化合物 2

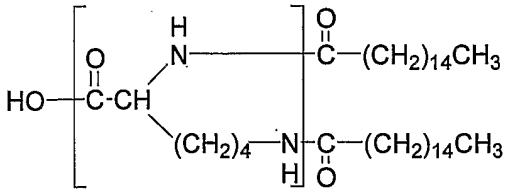
リジン誘導体2の分析結果：

薄層クロマトグラフィー(シリカゲルプレート、クロロホルム/メタノール(4/1)(容量/容量)：Rf：0.53 (モノスポット)。

赤外吸収スペクトル(cm^{-1})：3311 [ν_{N-H}(アミド)]；1748 [$\nu_{C=O}$(エステル)]；1640 [$\nu_{C=O}$(アミド)]；1553 [δ_{N-H}(アミド)]。

^{1}H-NMR スペクトル($CDCl_3$, 500 MHz , δ (ppm))：0.85 (t, 6H, $-CH_3$)；1.23 (s, 50H, $-CH_2-CH_2-$, lys γ $-CH_2$)；1.46 (m, 2H, lys δ $-CH_2$)；1.58 (m, 4H, -N-CO-C-CH_2-)；1.66 , 1.82 (m, 2H, lys β $-CH_2$)；2.12 , 2.20 (t, 4H, -N-CO-CH_2-)；3.16 (m, 2H, lys ε -CH_2)；4.58 (s, 1H, lys α $-CH_2$)；5.13 (s, 2H, $-CH_2$)；5.65 (br, 1H, -NH-CO-)；6.16 (d, 1H, -NH-CO-)；7.29-7.37 (5H, aroma.)。

(C) リジン誘導体2 (1.52 g、2.13 mmol)をクロロホルム/メタノール混合溶媒(10 / 7 (容量/容量))に溶解させ、1規定の水酸化ナトリウム水溶液(3.4 mL)を添加した。この反応混合物を 25℃で 4 時間撹拌した後、1 規定塩酸水溶液を添加し(pH 3.0 まで)、溶媒を減圧除去した。残分を水およびメタノールで洗浄し、乾燥してジパルミトイルリジン誘導体3（化合物3）を白色固体として得た(1.3 g、収率 98 %)。



化合物3

ジパルミトイルリジン誘導体3の分析結果：

薄層クロマトグラフィー(シリカゲルプレート、クロロホルム/メタノール(4/1)(容量/容量)：Rf：0.45 (モノスポット)。

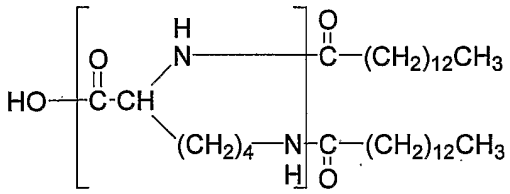
赤外吸収スペクトル(cm^{-1})：3305 [ν_{N-H}(アミド)]；1721 [$\nu_{C=O}$(カルボニル)]；1638 [$\nu_{C=O}$(アミド)]；1553 [δ_{N-H}(アミド)]。

^{1}H-NMR スペクトル($CDCl_3$, 500 MHz , δ(ppm))：0.84 (t, 6H, $-CH_3$)；1.24 (s, 50H, -

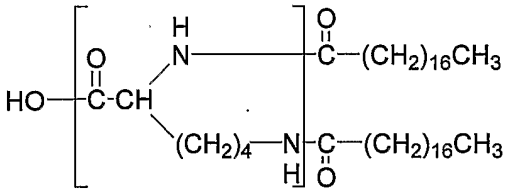
CH_2-CH_2- , lys γ -CH_2) ; 1.36 (m, 2H, lys δ -CH_2) ; 1.47 (m, 4H, -N-CO-C-CH_2-) ; 1.55 , 1.67 (m, 2H, lys β -CH_2) ; 2.02 , 2.09 (t, 4H, -N-CO-CH_2-) ; 2.99 (m, 2H, lys ε -CH_2) ; 4.14 (s, 1H, lys α -CH_2) ; 7.55 (br, 1H, -NH-CO-) ; 7.78 (d, 1H, -NH-CO-) ; 12.23 (br, 1H, -COOH)。

MS(LCQ) : C38H74N2O4 についての計算値 : 623.0 : 実測値 : 623.5 $(M^+H)^+$。

(D) パルミチン酸の代わりにミリスチン酸、ステアリン酸を用いた以外は上記(B)および(C)と同様の操作により、それぞれ白色固体のジアルキルリジン誘導体(ジミリストイルリジン誘導体 4（化合物 4）およびジステアロイル誘導体 5（化合物 5）)を得た。



化合物４



化合物５

ジミリストイルリジン誘導体 4 の分析結果 :

薄層クロマトグラフィー(シリカゲルプレート、クロロホルム/メタノール(4/1)(容量/容量) : Rf : 0.40 (モノスポット)。

赤外吸収スペクトル(cm^{-1}) : 3305 [ν_{N-H} (アミド)] ; 1721 [$\nu_{C=O}$ (カルボニル)] ; 1638 [$\nu_{C=O}$ (アミド)] ; 1553 [δ_{N-H} (アミド)]。

^{1}H-NMR スペクトル($CDCl_3$, 500 MHz , δ(ppm)) : 0.84 (t, 6H, -CH_3) ; 1.24 (s, 42H, -CH_2-CH_2- , lys γ -CH_2) ; 1.36 (m, 2H, lys δ -CH_2) ; 1.47 (m, 4H, -N-CO-C-CH_2-) ; 1.55 , 1.67 (m, 2H, lys β -CH_2) ; 2.02 , 2.09 (t, 4H, -N-CO-CH_2-) ; 2.99 (m, 2H, lys ε -CH_2) ; 4.14 (s, 1H, lys α -CH_2) ; 7.55 (br, 1H, -NH-CO-) ; 7.78 (d, 1H, -NH-CO-) ; 12.23 (br, 1H, -COOH)。

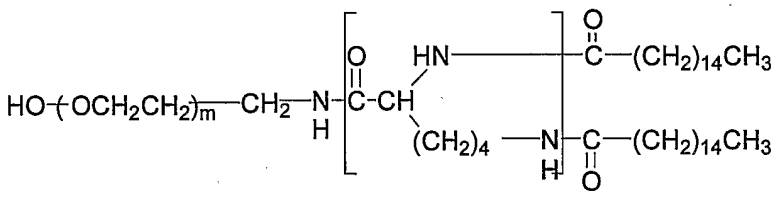
ジステアロイル誘導体5の分析結果：

薄層クロマトグラフィー(シリカゲルプレート、クロロホルム/メタノール(4/1)(容量/容量)：Rf：0.53 (モノスポット)。

赤外吸収スペクトル(cm^{-1})：3305 [ν_{N-H} (アミド)]；1721 [$\nu_{C=O}$ (カルボニル)]；1638 [$\nu_{C=O}$ (アミド)]；1553 [δ_{N-H} (アミド)]。

^{1}H-NMR スペクトル($CDCl_3$, 500 MHz , δ(ppm))：0.84 (t, 6H, $-CH_3$)；1.24 (s, 56H, $-CH_2-CH_2-$, lys γ $-CH_2$)；1.36 (m, 2H, lys δ $-CH_2$)；1.47 (m, 4H, $-N-CO-C-CH_2-$)；1.55 , 1.67 (m, 2H, lys β $-CH_2$)；2.02 , 2.09 (t, 4H, $-N-CO-CH_2-$)；2.99 (m, 2H, lys ε $-CH_2$)；4.14 (s, 1H, lys α $-CH_2$)；7.55 (br, 1H, -NH-CO-)；7.78 (d, 1H, -NH-CO-)；12.23 (br, 1H, -COOH)。

(E) ジパルミトイルリジン誘導体3とポリエチレングリコールとを以下のようにして結合させた。すなわち、ジパルミトイルリジン誘導体3 (125 mg、0.2 mmol)とDCC(41 mg、0.2 mmol)をクロロホルムに溶解し、4℃で1時間撹拌した後、分子量5000のモノメトキシアミノポリエチレングリコール(500 mg、0.1 mmol)とジメチルアミノピリジン(24 mg、0.2 mmol)を溶解したクロロホルム溶液中に滴下した。この反応混合物を25℃で6時間撹拌した後、グラスフィルター(G4)で濾過し、濾液をジエチルエーテルに滴下した。沈殿物を濾過回収し、乾燥した後、シリカゲルカラム(溶媒：クロロホルム/メタノール= 6/1 (容量/容量)で両親媒性化合物6（化合物6）を単離した(500 mg、収率 88 %)。



化合物6

化合物6の分析結果：

薄層クロマトグラフィー(シリカゲルプレート、クロロホルム/メタノール(4/1)(容量/容量)：Rf：0.73 (モノスポット)。

赤外吸収スペクトル(cm^{-1})：3294 [ν_{N-H}(アミド)]；1634 [$\nu_{C=O}$(アミド)]；1553 [δ_{N-H}(アミド)]。

^{1}H-NMR スペクトル($CDCl_3$, 500 MHz , δ(ppm))：0.88 (t, 6H, $-CH_3$)；1.25 (s, 50H, $-CH_2-CH_2-$, lys γ $-CH_2$)；1.32 (m, 2H, lys δ $-CH_2$)；1.63-1.80 (8H, $-CH_2-C-N-$, $-N-CO-C-CH_2-$, lys β $-CH_2$)；2.27 , 2.38 (t, 4H, $-N-CO-CH_2-$)；3.29 (m, 2H, lys ε $-CH_2$)；3.38 (3H, $-O-CH_3$)；3.43 (2H, $-CH_2-NH-$)；3.66 (PEG)；4.39 (s, 1H, lys α $-CH_2$)。

^{13}C-NMR ($CDCl_3$、500 MHz、δ (ppm))：14.12；22.68；25.74；28.75；29.34；29.53；29.65；31.92；36.35；38.13；59.02；70.44；71.95。

(F) 上記(E)と同様の操作により、ポリエチレングリコール(PEG)の分子量と疎水基の炭素数が異なる組合わせで次の化合物を得た。

P50-2C14 の分析結果：PEG 分子量（5000）、疎水基（$-(CH_2)_{14}CH_3\times2$）

薄層クロマトグラフィー(シリカゲルプレート、クロロホルム/メタノール(4/1)(容量/容量)：Rf：0.55 (モノスポット)。

赤外吸収スペクトル(cm^{-1})：3294 [ν_{N-H}(アミド)]；1634 [$\nu_{C=O}$(アミド)]；1553 [δ_{N-H}(アミド)]。

^{1}H-NMR スペクトル($CDCl_3$, 500 MHz , δ(ppm))：0.88 (t, 6H, $-CH_3$)；1.25 (s, 46H, $-CH_2-CH_2-$, lys γ $-CH_2$)；1.32 (m, 2H, lys δ $-CH_2$)；1.63-1.80 (8H, $-CH_2-C-N-$, $-N-CO-C-CH_2-$, lys β $-CH_2$)；2.15 , 2.23 (t, 4H, $-N-CO-CH_2-$)；3.29 (m, 2H, lys ε $-CH_2$)；3.38 (3H, $-O-CH_3$)；3.43 (2H, $-CH_2-NH-$)；3.66 (PEG)；4.39 (s, 1H, lys α $-CH_2$)。

P125-2C14 の分析結果：PEG 分子量（12500）、疎水基（$-(CH_2)_{14}CH_3\times2$）

薄層クロマトグラフィー(シリカゲルプレート、クロロホルム/メタノール(4/1)(容量/容量)：Rf：0.50 (モノスポット)。

赤外吸収スペクトル(cm^{-1})：3294 [ν_{N-H}(アミド)]；1634 [$\nu_{C=O}$(アミド)]；1553 [δ_{N-H}(アミド)]。

^{1}H-NMR スペクトル($CDCl_3$, 500 MHz , δ(ppm))：0.88 (t, 6H, $-CH_3$)；1.25 (s, 46H, $-CH_2-CH_2-$, lys γ $-CH_2$)；1.32 (m, 2H, lys δ $-CH_2$)；1.63-1.80 (8H, $-CH_2-C-N-$, $-N-CO-$

C-CH_2-, lys β -CH_2)；2.15 , 2.23 (t, 4H, -N-CO-CH_2-)；3.29 (m, 2H, lys ε -CH_2)；3.38 (3H, -O-CH_3)；3.43 (2H, -CH_2-NH-)；3.66 (PEG)；4.39 (s, 1H, lys α -CH_2)。

P125-2C16 の分析結果：PEG 分子量（12500）、疎水基（-$(CH_2)_{16}CH_3$×2）
薄層クロマトグラフィー(シリカゲルプレート、クロロホルム/メタノール(4/1)(容量/容量)：Rf：0.63 (モノスポット)。
赤外吸収スペクトル(cm^{-1})：3305 [ν_{N-H} (アミド)]；1638 [$\nu_{C=O}$ (アミド)]；1556 [δ_{N-H} (アミド)]。
^{1}H-NMR スペクトル($CDCl_3$, 500 MHz , δ(ppm))：0.88 (t, 6H, -CH_3)；1.25 (s, 50H, -CH_2-CH_2- , lys γ -CH_2)；1.32 (m, 2H, lys δ -CH_2)；1.63-1.80 (8H, -CH_2-C-N-, -N-CO-C-CH_2-, lys β -CH_2)；2.27 , 2.38 (t, 4H, -N-CO-CH_2-)；3.29 (m, 2H, lys ε -CH_2)；3.38 (3H, -O-CH_3)；3.43 (2H, -CH_2-NH-)；3.66 (PEG)；4.39 (s, 1H, lys α -CH_2)。

〔実施例２〕

本実施例では、実施例１の方法で得られたリジン型 PEG 脂質（以下「PEG 脂質」という）の小胞体への導入安定度および小胞体凝集抑制効果を PEG 脂質構造との相関から明らかにした。

小胞体分散液(17.0 mM, 15.0 mL)に PEG 脂質水溶液(17.0 μ M, 22.6 mL)を混合後 37℃にて撹拌し PEG 脂質導入小胞体分散液を得た。この PEG 脂質導入小胞体分散液をリン酸緩衝液(PBS, pH 7.0)で 6 倍希釈し、12 時間後まで経時的に導入量を測定した。導入量は以下のように算出できる(Yoshioka, H. Biomaterials 1991, 12, 861)。

PEG 脂質導入小胞体分散液を超遠心分離(33,000 rpm, 30 min)して、未導入 PEG 脂質を分離した後、真空乾燥して $CDCl_3$ に溶解した。不溶成分を PTFE フィルター(0.2 μ m)で除去した後、^{1}H-NMR 測定を行い、DPPC コリンメチルプロトン(δ =3.36 ppm)と PEG 鎖メチレンプロトン(δ =3.64 ppm)の面積比を利用して導入率を算出した。超遠心分離を行ったものと行っていないものの小胞体コリンメチルプロトンの積分値を一定としたときの PEG 鎖メチレンプロトンの積分値をそれぞれ H_{PEG+}、H_{PEG-}とし、PEG 脂質の仕込み濃度を A (mol%)とすると、PEG 脂質

導入量は次式から算出できる。

$$[\text{PEG-lipid}] = A \times (H_{PEG+} / H_{PEG-}) \quad (\text{mol\%})$$

PEG 脂質の小胞体からの脱離挙動

PBS(pH 7.0)により 6 倍希釈した後の PEG 脂質の小胞体からの脱離挙動の観測結果（1H-NMR）を図 2 に示した。図 2 中の記号はそれぞれ、(●) P50-2C14, (○) P125-2C14, (▲) P50-2C16, (△) P125-2C16, (□) P125-2C18, (■) P125-4C16, (◆) P50-DPPE, (◇) P125-DSPE を表す。2 本鎖の PEG 脂質については、P125-2C18（PEG 分子量（12500）、疎水基（-$(CH_2)_{16}CH_3$×2））、P125-4C16（PEG 分子量（12500）、疎水基（-$(CH_2)_{14}CH_3$×4））および P50-2C16（PEG 分子量（5000）、疎水基（-$(CH_2)_{14}CH_3$×2））では脱離が認められなかったのに対し、P125-DSPE（PEG 分子量（12500）がジステアロイルホスファチジルエタノールアミン DSPE に結合した PEG 脂質）や P125-2C16（PEG 分子量（12500）、疎水基（-$(CH_2)_{14}CH_3$×2））では 3 時間後には各々約 8%、約 10 %が小胞体から脱離した。他方、P50-2C14（PEG 分子量（5000）、疎水基（-$(CH_2)_{12}CH_3$×2））、P125-2C14（PEG 分子量（12500）、疎水基（-$(CH_2)_{12}CH_3$×2））では 12 時間後にそれぞれ約 20、30 %が小胞体から脱離した。従って PEG 鎖の分子量の増大あるいはアルキル鎖長を短くすることでリポソーム表面の PEG 鎖が脱離し易くなり、血中滞留性の制御ならびに指向性の増大が可能となった。

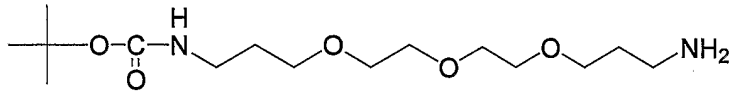
さらに、P50-2C16 では脱離が認められないのに対し、P50-DPPE（PEG 分子量（5000）疎水基（-$(CH_2)_{16}CH_3$×2））では 20 %程度が脱離した。なお、P50-DPPE は、PEG 分子量（5000）がジパルミトイルホスファチジルエタノールアミンに結合した PEG 脂質である。PEG-DPPE では、リン脂質頭部の親水性による脂質全体の親水性増大の影響が考えられる一方で、リジン型 PEG 脂質ではその影響がないばかりでなく、リジン骨格におけるアミド結合部と小胞体リン脂質エステル部の水素結合が安定導入に寄与していると考えられる。

〔実施例 3〕

1．新規膜貫通型脂質の合成

ジアミノ PEG（M.w.=220）を出発物質として、まず片末端を t-ブトキシ(Boc)基で保護した。ベンジルオキシカルボニル(Z)基を用いると最後の脱保護操作（接触還元、又は強酸）で疎水部のジスルフィドが切断される恐れがあるため、弱酸でも脱保護が可能な Boc 基を選択した。また、Boc 基の切断を防ぐため、酸の混入と加熱をできるだけ避けた。

4,7,10-Trioxa-1,13-tridecanediamine（6.6 g、30 mmol）とトリエチルアミン（TEA、1.5 g、15 mmol）を 20 mL 蒸留クロロホルムに溶解し、無水 t-ブトキシカルボニル（（Boc）$_2$O、3.3 g、15 mmol）の蒸留クロロホルム溶液（100 mL）を徐々に滴下して反応させた。4℃で 6 時間攪拌後、溶媒を減圧除去し、ベンゼンに再溶解して不溶の塩成分をろ過した。シリカゲルカラム（中性、溶媒：クロロホルム／メタノール（4／1）（容量／容量）精製により片末端のみを Boc 基で保護した PEG 脂質誘導体（7）（化合物 7）を淡黄色粘稠液体で得た（2.4 g、収率 50 %）。



化合物 7

PEG 脂質誘導体 7 の分析結果：

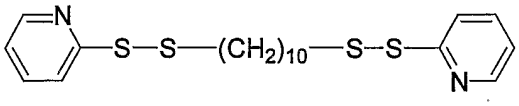
薄層クロマトグラフィー（シリカゲルプレート、クロロホルム／メタノール（4／1）（容量／容量）：R_f：0.27（モノスポット））。

赤外吸収スペクトル（cm^{-1}）：3363（ν_{N-H}）；1709（$\nu_{C=O}$）；1520（ν_{N-H}）；1271（ν_{C-O}）。

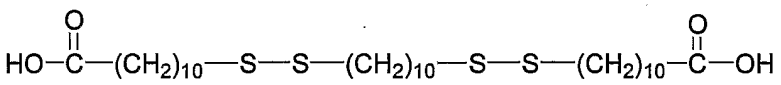
^{1}H-NMR（$CDCl_3$, 500 MHz, δ (ppm)）：1.43（s, 9H, t-butyl）；1.71-1.78（m, 4H, -CH_2-C-N-）；2.75-2.81（t, 2H, -CH_2-N）；3.20-3.39（br, 2H, -CH_2-N-）；3.49-3.65（m, 12H, POE）。

2,2'-dipyridyl disulfide(2-PD、4.3 g、19.2 mmol)を窒素雰囲気下、20mL 蒸留 THF 中で 1 時間攪拌して脱酸素後、1,10-decanedithiol（1.0 g、4.8 mmol）の THF 溶液（10 mL）を徐々に滴下させ、37℃で 10 時間、チオール・ジスルフィド交

換反応により 1,10-decanedithiol の両末端に PD 基を導入した（0.82 g、収率 40 %）。溶媒を減圧除去し、フラッシュカラム（シリカゲル、溶媒：クロロホルム／酢酸エチル（10／1）（容量／容量））により精製を行った。2-PD は 1,10-decanedithiol に対して 4 当量仕込んだが、アルキル鎖が数倍長い副生成物が得られて収率が低下したと考えられる。化合物 8 は ^{1}H-NMR、ESI-MS にて構造確認を行った。再び化合物 8（0.77 g、1.8 mmol）を窒素雰囲気下、20 mL 蒸留 THF 中で 1 時間攪拌して脱酸素を行い、10-carboxy-1-decanethiol（0.79 g、3.6 mmol）の THF 溶液（20 mL）を徐々に滴下して 10 時間反応させた。ジエチルエーテルにて再沈殿精製を 2 回行い、クロロホルムより再結晶して炭素鎖が 30 のジカルボン酸誘導体 9（化合物 9）を白色固体で得た（1.1 g、収率 93 %）。



化合物 8



化合物 9

化合物 8 及び 9 の分析結果：

(化合物 8)：薄層クロマトグラフィー（シリカゲルプレート、クロロホルム／酢酸エチル（10／1）（容量／容量）：R_f：0.7（モノスポット））。

^{1}H-NMR（$CDCl_3$, 500 MHz, δ (ppm)）：1.23-1.38（m, 12H, -CH_2-）；1.65-1.71（m, 4H, -S-C-CH_2-）；2.79（t, 4H, -S-CH_2-）；7.05-8.46（m, 8H, -C_5NH_4）。

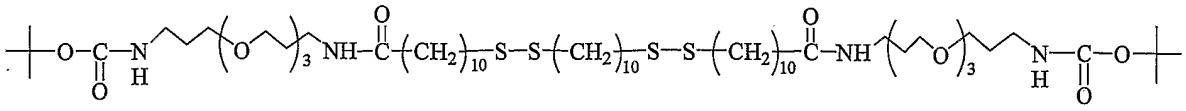
(化合物 9)：薄層クロマトグラフィー（シリカゲルプレート、クロロホルム／アセトン（4／1）（容量／容量）：R_f：0.23（モノスポット））。

赤外吸収スペクトル（cm^{-1}）：3038（ν_{O-H}）；1694（$\nu_{C=O}$）；1229（ν_{C-O}）。

^{1}H-NMR（$CDCl_3$, 500 MHz, δ (ppm)）：1.29-1.39（m, 36H, -CH_2-）；1.61-1.70（m, 12H, -CH_2-C-CO-, -CH_2-C-S-）；2.35 (t, 4H, -CH_2-CO-)；2.68 (t, 8H, -CH_2-S-)。

ジカルボン酸誘導体(化合物 9) (0.20 g、0.31 mmol)、BOP 試薬（0.30 g、0.69

mmol）、TEA（0.22 g、2.2 mmol）及び片末端アミノ PEG(化合物 7)（0.74 g、2.3 mmol）を 20 mL 蒸留クロロホルム中で 12 時間反応させ、アミド結合を形成させた。4 %クエン酸水溶液、及び水で分液を行い（クロロホルム相採取）、溶媒を減圧除去した後、フラッシュカラム（シリカゲル、溶媒：クロロホルム／アセトン（2／1）（容量／容量））により精製して化合物 10 を白色個体で得た（0.35 g、収率 91 %）。



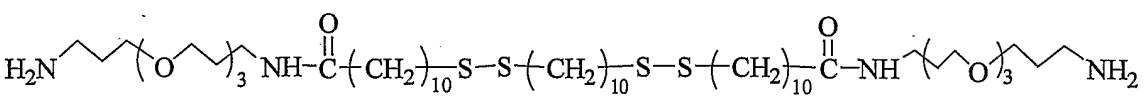
化合物１０

化合物 10 の分析結果：

薄層クロマトグラフィー（シリカゲルプレート、クロロホルム／アセトン（2／1）（容量／容量）：R_f：0.44（モノスポット））。

^{1}H-NMR（$CDCl_3$、500 MHz、δ (ppm)）：1.28-1.37（m, 36H, -CH_2-）；1.44（s, 18H, t-butyl）；1.56-1.70（m, 12H, -CH_2-C-CO-／-CH_2-C-S-）；1.73-1.80（m, 8H, -CH_2-C-N-）；2.13-2.16（t, 4H, -CH_2-CO-）；2.66-2.69（t, 8H, -CH_2-S-）；3.31-3.22（m, 4H, -CH_2-NH-COO-）；3.33-3.37（q, 4H, -CH_2-NH-）；3.53-3.66（m, 24H, POE）。

化合物 10（0.156 g、0.125 mmol）を 5 mL ジクロロメタンに溶解し、2,6-Lutidine（0.82 mL、1.5 M）及び Trimethylsilyl Triflate（0.89 mL、1 M）を加えて室温で 1 時間攪拌した。ニンヒドリンスプレーでアミノ基の出現を確認後、耐酸ポンプにて 60～70℃で溶媒を減圧除去し、水で 2 回洗浄した後、ジエチルエーテルにて再沈殿精製を行って、膜貫通型脂質(11)（化合物 11）を淡黄色固体で得た（0.12 g、収率 93 %）。



化合物１１

膜貫通型脂質 11 の分析結果：

薄層クロマトグラフィー（シリカゲルプレート、クロロホルム／メタノール（4／1）（容量／容量）：R_f：0.19（モノスポット））。

赤外吸収スペクトル（cm^{-1}）：3326（ν_{N-H}）；1637（$\nu_{C=O}$）；1540（ν_{N-H}）；1252（ν_{C-O}）；1114（ν_{C-O-C}）；1314（ν_{C-S}）。

^{1}H-NMR（$CDCl_3$、500 MHz、δ (ppm)）：1.28-1.43（m, 36H, -CH_2-）；1.59-1.80（m, 20H, -CH_2-C-CO-／-CH_2-C-S-／-CH_2-C-N）；2.13-2.16（t, 4H, -CH_2-CO-）；2.66-2.69（t, 8H, -CH_2-S-）；2.87-2.89（t, 4H, -CH_2-NH-C-O-）；3.32-3.36（q, 4H, -CH_2-NH-）；3.54-3.65（m, 24H, POE）。

2. 蛋白質担持リポソームの調製

DPPC（1.0 g, 1.36 mmol）、コレステロール（0.42 g, 1.09 mmol）、DPEA（0.19 g, 0.27 mmol）の混合脂質に、膜貫通型脂質(11)（8.5 mg, 8.16 μmol）を 0.3 mol%混合して 5 mL ベンゼンに溶解後、凍結乾燥を行った。ベンゼンを除去した後、脂質濃度が約 2 wt%になるようリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に水和した（r.t.、終夜）。その後、凍結融解処理を行い、extrusion 法にて最終孔径 50 nm まで透過させた。超遠心分離にて外水相を洗浄した後、リン脂質定量で濃度を調整して、粒径が約 140 nm の 1 枚膜リポソームを調製した。

3. 膜貫通型脂質の導入量測定

導入量は、膜貫通型脂質の両末端アミノ基にフルオレスカミンにて蛍光標識して、蛍光測定により定量した。膜貫通を証明する為に、(a)リポソーム表面アミノ基のみ、及び(b)リポソーム中の全アミノ基の 2 通りの測定を行い、両者を比較した。

Glu2C16（30 mg, 50 μmol）に THF、フルオレスカミン（42 mg, 0.15 mmol）を加えて 15 分攪拌て希釈後、蛍光測定(λ_{ex} = 390 nm, λ_{em} = 475 nm)により検量線を作成した（R^2＝0.9994）。

(a)：リポソーム分散液（[DPPC]＝1 wt%, 1 mL）に 100 μL フルオレスカミン（10 mg／500 μL アセトン）を加えて 15 分間攪拌後、超遠心分離で未反応のフ

ルオレスカミンを除去した。THFに再溶解し、蛍光測定（λ_{ex} = 390 nm, λ_{em} = 475 nm）を行った。

(b)：リポソーム分散液（[DPPC]＝1 wt%, 1 mL）をTHFに溶解し、100μLフルオレスカミン（10 mg／500μL アセトン）を加えて15分間攪拌後、蛍光測定（μ_{ex} = 390 nm, μ_{em} = 475 nm）を行った。

[結果]

蛍光測定の結果、リポソーム表面アミノ基は全アミノ基の約50 %であった（表1）。以上の結果、及び長鎖アルキルがメチレン同士の立体障害を最小にする為に真っ直ぐなコンホメーションをとり易い事を考慮すると、今回導入した合成脂質はリポソーム二分子膜を貫通して膜内に固定化され、末端アミノ基がリポソーム表面から充分に露出していると結論できる。

表1 リポソーム中のアミノ基量

Outer amino group of liposome (mol%)	0.20
Total amino group of liposome (mol%)	0.42
Exposed amino group (%)	48
Outer amino group per liposome ($\times 10^2$)	6.5

4. リポソーム表面への蛋白質の導入

調製したリポソームの表面アミノ基に、架橋剤 N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP)及び N-Succinimidyl 3-Maleimidopropionate (SMDP)を用いて、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)標識したモデル蛋白質(□-Lactalbumin(分子量:14 kDa)、rHSA(66.5 kDa)、IgG(150 kDa)、Ferritin(460 kDa)、Thyrogrobulin(670 kDa))を結合させた。蛋白質は電気泳動マーカーの中から、分子量依存性を解析するために等電点の近いものを選択した（表2）。

表2 蛋白質の特性

	M.w.(kDa)	Isoelectric point
α-Lactalbumin	14	4.1-4.8
rHSA	66.5	5.1
IgG	150	
Ferritin	460	4.0-5.0
Thyrogrobulin	670	4.5

［蛋白質の調製］

蛋白質 2.0 g/dL (1 mL、PBS)に SPDP(3.8 mg/Ethanol 2 mL)を 8 μ L(1.5 eq)添加、室温にて 30 分攪拌した。その後、FITC (6 mg/1N NaOH 250 μ L, PBS 750 μ L)を 200 μ L(5 eq)添加、室温にてさらに 30 分攪拌した。ゲルカラムクロマトグラフィー(Sephadex G25)にて未反応の SPDP、FITC を除去した。DTT(15.4 mg/PBS 1 mL)を 40 μ L(20 mM)添加し、30 分攪拌後、ゲルカラムクロマトグラフィー(Sephadex G25)にて未反応の DTT を除去した。

［SMDP 結合リポソーム調製］

膜貫通型脂質導入リポソーム分散液（PBS 5 mL, [DPPC]＝2.8 g/dL）に SMDP(30 mg/500 μ L DMF)を 38 μ L 添加し、室温にて 1 時間撹拌した。超遠心分離(33,000 rpm、60 min×2)より未反応の SMDP を除去した。

［蛋白質結合リポソーム調製］

SMDP 導入リポソーム分散液 (PBS 4 mL ([Lipid] = 0.6 g/dL)に SPDP 導入蛋白質溶液(0.4 g/dL)を 1 mL 添加し、4℃にて 12 時間攪拌した。遠心分離(10,000 rpm、5 min×3)より未反応の蛋白質を除去し、リポソーム表面にそれぞれ 5 種類の蛋白質を結合させた。

［蛋白質結合量の定量］

調製した蛋白質結合リポソーム分散液をエタノール溶液に溶解し、溶液の蛍光強度(λ_{ex}=490 nm, λ_{em}=520 nm)を測定して導入された蛋白質の結合数及びリポソーム表面アミノ基に対する結合率を算出した(表 3)。

表3 蛋白質の結合率

protein	Mw (kDa)	The Number of protein conjugated to a liposome	Conjugation ratio of proteins (%)
α-Lactalbumin	14	335	52
rHSA	66.5	141	21
IgG	150	106	16
Feritin	460	59	10
Thyrogrobulin	670	46	7

5. 蛋白質結合膜貫通型脂質の脱離速度測定

調製した 5 種の蛋白質(FITC 標識)結合リポソームを pH 7.4、37℃にて振とうし、蛋白質の脱離挙動を蛍光測定した。

[実験方法]

蛋白質結合リポソーム分散液 (PBS 10 mL、[Lipid] = 0.8 g/dL、4℃保存)を 37℃にて振とうした。開始 5 分後に control(0 min)1 mL を採取し、遠心分離(10,000 rpm、5 min)後、上澄み(700 μL)の蛍光測定を行い (FITC、λex = 490 nm、λem = 520 nm)、検量線より脱離した蛋白質を定量した。2、4、8、12、24 時間後も同様の操作により、脱離した蛋白質量の経時変化を測定した。結果を図 3 に示した。図 3 中の記号はそれぞれ、(●)α-Lactalbumin、(■)rHSA、(□)IgG、(▲)Ferritin、(△)Thyroglobulin を表す。

蛋白質分子量の増加に伴いリポソーム表面からの脱離が促進されたが、分子量が 66.5 kDa の rHSA までは約 90 %が安定に保持された。

6. 膜透過性還元剤添加による脱離効果

前述の脱離評価より、最も脱離が少なかったα-Lactalbumin 結合リポソームについて、膜透過性の還元剤である L-システイン(Cys)を外水相に共存させて脱離評価を行った。

[実験方法]

α-Lactalbumin 結合リポソーム分散液 (PBS 1 mL×8 サンプル、[Lipid] = 0.8 g/dL、4℃保存)を窒素雰囲気下で撹拌(30 min、4℃)後、20 mM Cys 溶液を添加し、pH 7.4、37℃にて振とうした。開始 5 分後に control(0 min)1 mL を採取し、遠心

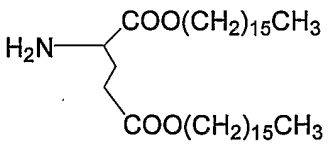
分離(10,000 rpm、5 min)後、上澄み(700μL)の蛍光測定を行って(FITC、λex = 490 nm、λem = 520 nm)、検量線より脱離した蛋白質を定量した。2、4、8、12、24 時間後も同様の操作により、脱離した蛋白質量の経時変化を測定した。結果を図 4 に示した。図 4 中の記号はそれぞれ、(●)α-Lactalbumin（Cys 無添加系）、(○) α-Lactalbumin＋Cys 溶液（Cys 添加系）を表す。

Cys 無添加系では 24 時間後でも 90 %以上がリポソーム表面に保持されていたが、Cys 添加系では徐々に蛋白質の脱離が促進され、24 時間後には 95 %が脱離した。Cys がリポソーム二分子膜を透過し、二分子膜内に導入した膜貫通脂質のジスルフィド結合を還元することによる脱離効果であると考えられる。

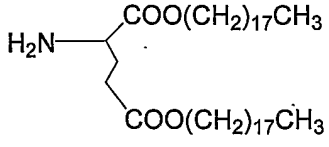
〔実施例４〕

1. 多アルキル鎖型糖脂質の合成

p-トルエンスルホン酸一水和物(4.56 g、24 mmol)のベンゼン溶液(100 mL)を85℃にて沸点還流し、ジンスタークを用いて反応前に水を除去した。反応液にグルタミン酸(2.96 g、20 mmol)とヘキサデシルアルコール (10.7 g、44 mmol)、またはオクタデシルアルコール(10.7 g、44 mmol)を添加し、10 時間生成水を除去しながら沸点還流した。反応の進行に伴い、懸濁液は徐々に溶解し黄色透明に変化した。反応終了後、溶媒を減去し、炭酸ナトリウム飽和水溶液/クロロホルムにて 3 回分液操作を行った後、硫酸マグネシウムにて脱水、メタノール 4℃にて再結晶を行い、ジアシルグルタミン酸誘導体 12（化合物 12）(83%)および 13（化合物 13）(85%)を得た。



化合物１２



化合物１３

ジアシルグルタミン酸誘導体 12 の分析結果：

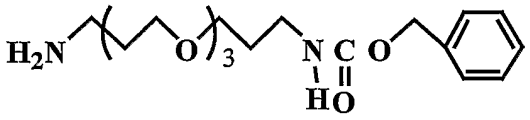
薄層クロマトグラフィー（シリカゲルプレート、クロロホルム／メタノール（4／1）（容量／容量）：R_f：0.83（モノスポット））。

赤外吸収スペクトル (cm^{-1})：1737 ($\nu_{C=O,ester}$).

^{1}H-NMR ($CDCl_3$、500 MHz、δ ppm)：0.89 (t,6H,-CH_3)；1.25 (s,52H,-CH_2-CH_2-)；1.62 (m,4H,-CO-O-C-CH_2)；1.84 (m,1H,glu β -CH_2)；2.08 (m,1H, glu β -CH_2)；2.45 (t,2H, glu γ -CH_2)；3.45 (t,1H, glu α -CH)；4.06,4.10 (t,4H, -CO-O-CH_2)

MS(ESI) Calcd：595.9 ；Found：597.3 $(MH)^+$.

両末端アミン PEG(9.01 g、41 mmol)のクロロホルム溶液(10 mL)にトリエチルアミン(5.71 mL、41 mmol)を添加し、室温にて攪拌した。Z クロライド(6.98 g、41 mmol)のクロロホルム溶液を滴下漏斗にてゆっくりと(2 秒に 1 滴程度)滴下した。反応は滴下に伴って速やかに進行し、TLC(クロロホルム/メタノール＝4/1, シリカゲルプレート)にて片末端保護の目的物が出現(Rf=0.42)するが、この他に両末端保護の副生成物(Rf=0.81)も生成した。反応終了後、溶媒を減去、カラムクロマトグラフィー(シリカゲル, クロロホルム/メタノール＝4/1)により両末端保護の副生成物と TEA 塩酸塩を除去そ、目的の化合物 14 を精製した。化合物の同定は IR および ^{1}H-NMR、ESI-MS により行った。また、TEA 塩はベンゼン、酢酸エチルに不溶であり、これを用いて除去も可能である。



化合物１４

化合物 14 の分析結果：

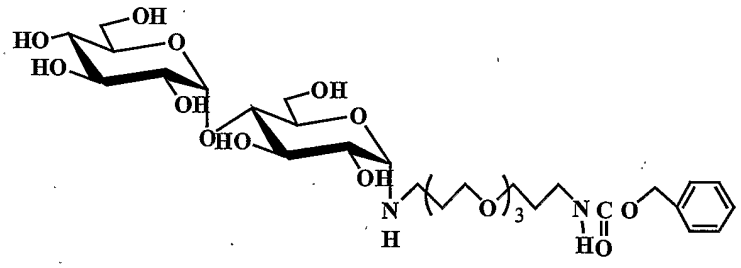
薄層クロマトグラフィー（シリカゲルプレート、クロロホルム／メタノール（4／1）（容量／容量）：R_f：0.42（モノスポット））。

赤外吸収スペクトル(cm^{-1})：1713($\nu_{C=O,ester}$)；1623($\nu_{C=O,amide}$)；1528($\delta_{N-H,amide}$).

^{1}H-NMR($CDCl_3$、500 MHz、δ ppm)：1.25(br,2H,NH_2-C-)；1.80(m,2H,NH_2-C-CH_2-)；1.94(m,2H, CONH-C-CH_2-)；3.11(m,2H, NH_2-CH_2-)；3.30(q,2H,CONH-CH_2-)；3.58(t,12H, -O-CH_2-)；5.08(s,2H, C_6H_5-CH_2-)；7.34(t,5H, C_6H_5-CH_2-)；7.57(br,1H, -CONH-)

MS(ESI) Calcd：354.4；Found：355.4 $(MH)^+$.

化合物 14(500 mg、1.4 mmol)の DMF 溶液(5 mL)にトリエチルアミン(196μL、1.4 mmol)、マルトース(507 mg、1.4 mmol)を添加して 70℃、12 時間攪拌した。反応の進行に伴い、TLC(クロロホルム/メタノール/水＝65/25/4,シリカゲルプレート)にて目的物のスポットが出現(Rf=0.09)した。反応終了後、溶媒を減去し、カラムクロマトグラフィー(シリカゲル, クロロホルム/メタノール/水＝65/25/4)により、目的の化合物 15 を精製した。化合物の同定は IR および ^{1}H-NMR、ESI-MS により行った。



化合物１５

化合物 15 の分析結果：

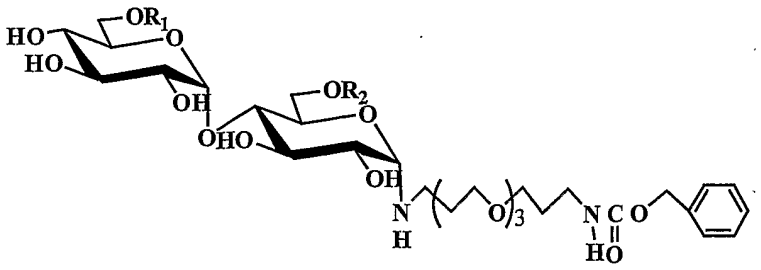
薄層クロマトグラフィー（シリカゲルプレート、クロロホルム／メタノール／水（65／25／4）（容量／容量）：R_f：0.18（モノスポット））。

赤外吸収スペクトル(cm^{-1})：1720($\nu_{C=O}$、ester)；1654($\nu_{C=O}$、amide)；1540(δ_{N-H}、amide).

^{1}H-NMR(D_2O、500 MHz、δ ppm)：1.71(m,2H, NH-C-CH_2-)；1.84(m,2H, CONH-C-CH_2-)；3.07(m,2H, NH-CH_2-)；3.15(m,2H, CONH-CH_2-)；3.21(t,1H, maltoseC-4)；3.31(t,1H, maltoseC-4)；3.57(t,12H, -O-CH_2-)；3.49-3.96(m,10H, maltoseC-2,3,5,6)；

4.59(d,1H, maltoseC-1) ; 5.05(br,1H, maltoseNH-C-C-) ; 5.16(d,1H, maltoseC-1,anomericH) ; 5.33(d,2H, C_6H_5-CH_2-) ; 7.37(t,5H, C_6H_5-CH_2-) ; 8.39(br,1H, -CONH-). MS(ESI) Calcd : 678.7 ; Found : 679.4 $(MH)^+$.

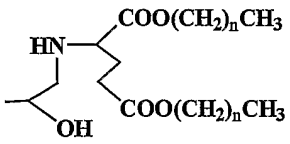
化合物 15(1.00 g、1.4 mmol)の DMF 溶液(10 mL)にトリエチルアミン(698 μL、5.0 mmol)、エピクロロヒドリン(228 μL、2.8 mmol)を添加し、40℃にて 2 時間攪拌した。反応の進行に伴い、TLC(クロロホルム/メタノール/水＝65/25/4,シリカゲルプレート)にてエポキシ基の導入による新たなスポットが出現(Rf=0.19,0.27)したが、化合物 16 の単離は行わず、続く反応により 12(Glu2C16、2.33 g、3.9 mmol)を添加し、60℃にて 18 時間攪拌し、エポキシ基に結合させた。反応終了後、DMF を減去し、カラムクロマトグラフィー(シリカゲル, クロロホルム/メタノール＝10/1)により 2 本鎖糖脂質 17(Rf＝0.38,クロロホルム/メタノール＝10/1, シリカゲルプレート)、4 本鎖糖脂質 19(Rf＝0.50)を精製した。化合物の同定は IR および ^{1}H-NMR、ESI-MS により行った。炭素数 18 の糖脂質、2 本鎖 18(Rf＝0.40,クロロホルム/メタノール＝10/1,シリカゲルプレート)、4 本鎖 20(Rf＝0.51)も同様に合成した。



化合物17：n=15

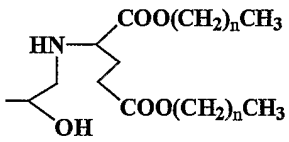
化合物18：n=17

R1 or R2 = OH

R1 or R2 = 

化合物19：n=15

化合物20：n=17

R1 = R2 = 

本反応は水酸基の反応性の差異を利用して6位の一級水酸基にアルキル鎖を導入するものである。アルキル鎖4本の導入では、エステル結合を用いて導入を試みたがアルキルグルタメート同士の立体障害により収率が低く単離が困難であった。より活性の高いエポキシ基を用いることでアルキル鎖4本の導入および単離が可能となり、糖脂質17～20（化合物17～20）の合成が可能であった。

糖脂質19 (4C16)の分析結果：

薄層クロマトグラフィー（シリカゲルプレート、クロロホルム／メタノール（10／1）（容量／容量）：R_f：0.50（モノスポット））。

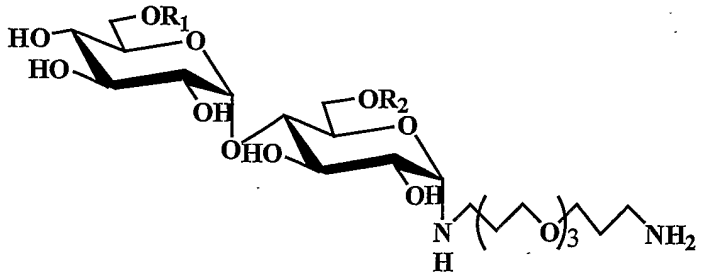
赤外吸収スペクトル(cm^{-1})：1731($\nu_{C=O}$、ester)；1672($\nu_{C=O}$、amide)；1521(δ_{N-H}、amide).

^{1}H-NMR(CD_3OD、500 MHz、δ ppm)：0.89(t,12H,-CH_3)；1.28(s,104H,-CH_2-CH_2-)；1.64(m,8H,-CO-O-C-CH_2)；1.74(m,4H, glu β -CH_2, NH-C-CH_2-)；2.01(m,2H,

CONH-C-CH_2-) ； 2.14(m,2H, glu β -CH_2) ; 2.29-2.35(m,8H, NH-CH_2-C(OH)-C-O-, NH-C-C(OH)-CH_2-O-) ; 2.45(m,4H, glu γ -CH_2) ; 2.55(m,2H, NH-C-CH(OH)-C-O-) ; 3.11(m,2H, NH-CH_2-) ; 3.18(m,2H, CONH-CH_2-) ； 3.49-3.74(m,12H, maltoseC-2,3,4,5,6) ; 3.51(m,14H, -O-CH_2-,glu α -CH) ; 4.06(t,2H, maltoseC-1) ； 4.15(t,4H, -CO-O-CH_2) ; 4.27(t,4H, -CO-O-CH_2) ; 5.05(m,2H, C_6H_5-CH_2-) ; 7.33(t,5H, C_6H_5-CH_2-) ; 8.01(br,1H, -CONH-).

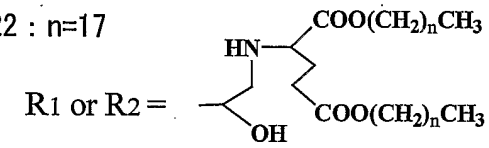
MS(ESI) Calcd : 1981.4 ;Found:1981.4$(MH)^+$.

化合物 17 (20 mg、10 nmol)のエタノール溶液(3 mL)に Pd ブラック粉末(20 mg)(または Pd/C 粉末)を添加し、H_2 ガス(Zn/H_2SO_4 にて発生)通気下、室温にて 4 時間攪拌した。反応の進行に伴い、TLC にて、ニンヒドリン陽性のスポット、21(Rf＝0.09,クロロホルム/メタノール＝10/1,シリカゲルプレート)が出現した。反応終了後、Pd 粉末を濾別し、溶媒を減去した後、カラムクロマトグラフィー(シリカゲル, クロロホルム/メタノール/水＝5/1)により目的の化合物 21 を精製した。化合物の同定は IR および ^{1}H-NMR、ESI-MS により行った。化合物 21 (Rf＝0.12,クロロホルム/メタノール＝10/1,シリカゲルプレート)、化合物 22 (Rf＝0.03)、化合物 24 (Rf＝0.03)も同様に合成した。



化合物21：n=15

化合物22：n=17

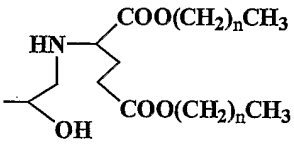


R1 or R2 =

R1 or R2 = **OH**

化合物23：n=15

化合物24：n=17



R1 = R2 =

化合物 23 (4C16)の分析結果：

薄層クロマトグラフィー（シリカゲルプレート、クロロホルム／メタノール（10／1）（容量／容量）：R_f：0.09（モノスポット））。

赤外吸収スペクトル(cm^{-1})：1738($\nu_{C=O,}$ester).

^{1}H-NMR(CD_3OD、500 MHz、δ ppm)：0.89(t,12H,-CH_3)；1.28(s,104H,-CH_2-CH_2-)；1.61(m,8H,-CO-O-C-CH_2)；1.77(m,4H, glu β -CH_2, NH-C-CH_2-)；1.92(m,2H, CONH-C-CH_2-)；2.14(m,2H, glu β -CH_2)；2.24-2.41(m,8H, NH-CH_2-C(OH)-C-O-, NH-C-C(OH)-CH_2-O-)；2.44(m,4H, glu γ -CH_2)；2.68(m,2H, NH-C-CH(OH)-C-O-)；3.09(m,2H, NH-CH_2-)；3.15(m,2H, CONH-CH_2-)；3.49-3.79(m,12H, maltoseC-2,3,4,5,6)；3.63(m,14H, -O-CH_2-,glu α -CH)；4.06(t,2H, maltoseC-1)；4.15(t,4H, -CO-O-CH_2)；4.28(t,4H, -CO-O-CH_2).

2. 多アルキル鎖型糖脂質の臨界ミセル濃度測定

[方法]

糖脂質(化合物 21～24)分散液(純水 2mL, 1, 5, 10, 20, 30, 50, 100 μ M)に DPH 溶液(30 μ M, THF)を 2 μ L 添加し、37℃にて 2 時間で振とうした。37℃にて、蛍光測定(DPH、λex = 357 nm、λem = 430 nm)により、蛍光強度が急激に上昇する糖脂質濃度を臨界ミセル濃度(CMC)とした。

[結果]

化合物 21 の CMC は 20 μ M であるのに対し、化合物 22 では 18 μ M となり、アルキル鎖長を C16 から C18 にすることで CMC は若干低下した。他方、化合物 23 の CMC は 8.0 μ M、化合物 24 では 7.0 μ M であり、アルキル鎖数を 2 本から 4 本に増加させることで大幅な CMC の低下が認められた。このことから、アルキル鎖数を増加させることが疎水性相互作用の増大に有効であることを確認した。結果を図 5 に示した。図 5 中の記号はそれぞれ、(□)21 (2C16)、(■)22 (2C18)、(○)23 (4C16)、(●)24 (4C18) を表す。

3. 糖脂質導入リポソームの調製

DPPC (600 mg)、コレステロール (316 mg)あるいは糖脂質(化合物 21 (3.9 mg)、化合物 22 (4.1 mg)、化合物 23 (6.0 mg)、化合物 24 (6.4 mg)) (DPPC/コレステロール= 1/1 (モル比)、糖脂質 = 0.20 mol%)をクロロホルム 30 mL に溶解して混合した。クロロホルムをエバポレーターにて除去し、真空乾燥後、PBS 50mL 中にて 12 時間水和攪拌した ([Lipid] = 2.0 g/dL)。水和後、45℃にて 4 時間アニーリング処理し、エクストリューダーにて造粒(3000→800→650→450→300→220 nm ×2)し、粒径制御した。遠心分離(10,000 rpm、5 min×3)により外水相を除去、PBS 中に再分散して糖脂質含有リポソーム分散液を調製した。

4. リポソーム表面の糖脂質定量

リポソーム分散液 (PBS 1 mL, [Lipid] = 0.15 g/dL)中にフルオレスカミン (30 mg/Acetone 450 μ L)を 100 μ L 添加して、室温にて 30 分攪拌した。遠心分離(10,000 rpm、5 min×3)にて、未反応のフルオレスカミンを除去し、クロロホル

ム/メタノール = 2/1 に溶解(総量 2 mL)して、蛍光測定(λex = 390 nm, λem = 475 nm)よりリポソーム表面のアミノ基を定量した(表 4)。

表 4 リポソームの特性及びリポソーム表面のNH_2基量

Glycolipid	Diameter (nm)	Outer NH 2 (mol%)	Ratio of outer NH 2 (%)	Outer NH 2 per liposome (× 10^2)
21 (2C16)	280 ± 110	0.052	26	3.5
22 (2C18)	290 ± 120	0.044	22	3.1
23 (4C16)	270 ± 100	0.044	22	2.7
24 (4C18)	280 ± 110	0.046	23	3.1

5. リポソーム表面への蛋白質の導入

架橋剤 SPDP を用いてリポソーム表面に導入した NH_2 基、および蛋白質表面の NH_2 基をジスルフィド結合にて架橋し、リポソーム表面にそれぞれ 5 種類の蛋白質を結合させた(表 5)。

表5 蛋白質の特性

	Mw (kDa)	Isoelectric point (-)
α-lactalbumin (from bovie milk)	14.0	4.1-4.8
rHSA	66.5	5.1
Catalase (from bovie liver)	232	5.5
Ferritin (from equine spleen)	440	4.0 -5.0
Thyroglobulin (from bovie thyroid)	670	4.5

[蛋白質の調製]

蛋白質 2.0 g/dL (1 mL、PBS)に SPDP(3.8 mg/Methanol 2 mL)を 8 μL(1.5 eq)添加し、室温にて 30 分攪拌した。その後、FITC (6 mg/1N NaOH 250 μL, PBS 750 μL)を 200 μL(5 eq)添加し、室温にてさらに 30 分攪拌した。ゲルカラムクロマトグラフィー(Sephadex G25)にて未反応の SPDP、FITC を除去した。DTT(15.4

mg/PBS 1 mL)を 40μL(20 mM)添加し、30 分攪拌後、ゲルカラムクロマトグラフィー(Sephadex G25)にて未反応の DTT を除去した。

[SPDP 結合リポソーム調製]

糖脂質導入リポソーム分散液 (PBS 10 mL [Lipid] = 2.0 g/dL)に SPDP(8 mg/Methanol)を 450μL 添加し、室温にて 30 分攪拌した。遠心分離(10,000 rpm、5 min×3)より未反応の SPDP を除去した。

[蛋白質結合リポソーム調製]

SPDP 導入リポソーム分散液 (PBS 4 mL ([Lipid] = 0.6 g/dL)に SPDP 導入蛋白質溶液(0.4 g/dL)を 1 mL 添加、4℃にて 12 時間攪拌した。遠心分離(10,000 rpm、5 min×3)より未反応の蛋白質を除去し、リポソーム表面にそれぞれ 5 種類の蛋白質を結合させた。

[蛋白質結合量の定量]

蛋白質結合リポソーム分散液(PBS 1 mL [Lipid] = 0.8 g/dL)に DTT(15.4 mg/PBS 1 mL)を 20μL(20 mM)添加し、37℃にて 4 時間攪拌した。遠心分離(10,000 rpm、5 min)後、上澄み(700μL)を蛍光測定(FITC、λex = 490 nm、λem = 520 nm)、検量線から結合蛋白質量を定量した(表 6)。

表6 蛋白質結合量

	Mw (kDa)	Proteins per liposome (×10)	Binding efficiency (%)
α-lactalbumin	14.0	18	55
rHSA	66.5	14	44
Catalase	232	10	30
Ferritin	440	9.2	28
Thyroglobulin	670	8.3	25

6. 蛋白質結合糖脂質の脱離速度測定

調製した 5 種の蛋白質(FITC 標識)結合リポソームを pH 7.4、37℃にて振とう

し、蛋白質結合糖脂質の脱離挙動を蛍光測定した。

[実験方法]

蛋白質結合リポソーム分散液 (PBS10 mL、[Lipid] = 0.8 g/dL、4℃保存)を 37℃にて振とうした。開始 5 分後に control(0 min)1 mL を採取、遠心分離(10,000 rpm、5 min)後、上澄み(700 μL)の蛍光測定 (FITC、λex = 490 nm、λem = 520 nm)、検量線より脱離した蛋白質結合糖脂質を定量した。2、4、8、12、24 時間後も同様の操作により、脱離した蛋白質量の経時変化を測定した。結果を図 6 に示した。図 6 中、(a)はα-Lactalbumin (Mw: 14.0 kD)、(b)は r-HSA (Mw: 66.5 kD)、(c)は Catalase (Mw: 232 kD)、(d)は Ferritin (Mw: 440 kD)、(e)は Thyrogroburin (Mw: 669 kD)の測定結果であり、図 6 中の記号はそれぞれ、(□)21 (2C16) 、(■)22 (2C18) 、(○)23 (4C16) 、(●)24 (4C18) を表す。

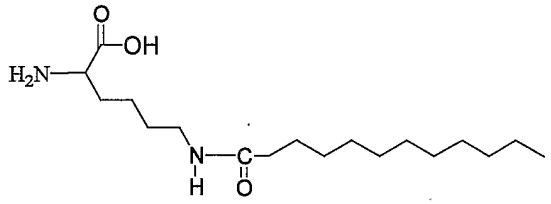
Ferritin(Mw:440kDa)の測定結果では、化合物 21 の脱離速度は 12 %/hr であるのに対し、化合物 22 では 11 %/hr となり、アルキル鎖長を C18 にすることで脱離速度は若干抑制された。他方、化合物 23 の脱離速度は 4.4 %/hr、化合物 24 では 3.5 %/hr であり、2C (2 本鎖) 群と比較してそれぞれ 0.36 倍、0.32 倍となり、アルキル鎖数を 2 本から 4 本に増加させることで脱離速度は大幅に抑制され、24 時間後に 2.3 倍の蛋白質の保持に成功した。また、これらの脱離速度の差異は糖脂質の CMC と一致しており、さらに脱離速度を抑制するには糖鎖の水酸基をアセチル基に変換して疎水部とし、CMC を小さくする方法が考えられる。

次に、蛋白質分子量と脱離速度との関係を図 7 に示した。図 7 中の記号はそれぞれ、(□)21 (2C16) 、(■)22 (2C18) 、(○)23 (4C16) 、(●)24 (4C18) を表す。2 本鎖では、蛋白質分子量 31 倍(14 kDa～440 kDa)の増加に対して脱離速度は 10.7 倍(1.0 %/hr～10.7 %/hr)に促進された。他方、4 本鎖では脱離速度は 5.0 倍(0.7 %/hr～3.9 %/hr)であり、蛋白質分子量 440 kDa までは分子量が増大しても脱離速度はほとんど促進されなかった。これは、4 本鎖では 440 kDa までは分子量の増大に伴い脱離速度の抑制効果が大きくなることを示している。しかし、440 kDa 以上では 4 本鎖でも脱離し易くなり、アルキル鎖数の違いによる影響は分子量の増大と共に小さくなるものと考察される。

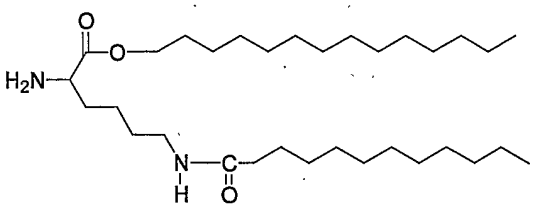
〔実施例５〕

pH応答性脂質の合成

Z-Lys(H)-OBzl・benzenesulfonate (1.5 g、2.8 mmol)、BOP試薬(1.5 g、3.4 mmol)、lauric acid (380 mg、3.4 mmol)、TEA(0.34 g、3.4 mmol)を30 mL蒸留ジクロロメタン中で4℃、6時間反応させ、アミノ結合を形成させた。飽和炭酸ナトリウム、および水で分液を行い(クロロホルム相採取)、溶媒を減圧除去後、淡黄色粘稠液体を得た(2.01 g、収率 91%)。その後接触還元法にて脱保護し、カラム(シリカゲル、クロロホルム/メタノール=(8/1)(容量/容量))による精製を行って25を淡黄色粘稠液体で得た(596 mg、収率 50 %)。25(596 mg、1.1 mmol)とp-トルエンスルホン酸一水和物(259 mg、1.4 mmol)、n-テトラデカノール(300 mg、1.4 mmol)をベンゼン100 mL中で105℃、12時間沸点還流しエステル結合を形成させた。飽和炭酸ナトリウム水溶液、および水で分液を行い(クロロホルム相採取)、溶媒を減圧除去後、メタノール再結晶による精製を行い白色固体 26(550 mg、収率 58%)を得た。



化合物２５



化合物２６

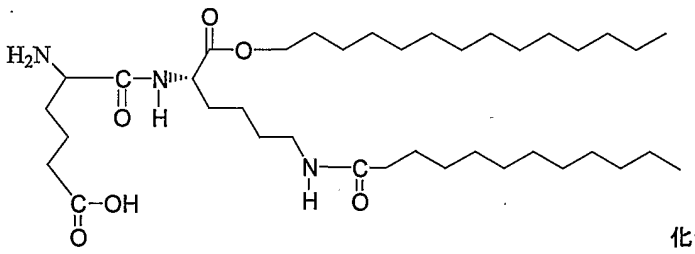
化合物26の分析結果：

薄層クロマトグラフィー(シリカゲル、クロロホルム/メタノール(8/1)(容量/容量) : R_f: 0.50(モノスポット))

1H-NMR($CDCl_3$、500 MHz、δ (ppm)) : 0.88 (t, 6H, $-CH_3$) ; 1.25 (m, 38H, $-CH_2-$, -Lys-β-γ-,CH_2-) ; 1.6 (m, 4H, -CO-O-CH_2-, -NH-CO-C-CH_2-) ; 2.2 (m, 2H, -CH_2-N-CO-

) ; 3.6 (t, 1H, -Lys-) ; 4.0 (t , 4H, -COO-CH_2-, -N-CO-CH_2-) ; 4.9(b, 1H, -N-H-C-O-)。

化合物 26(200 mg、0.38 mmol)、BOP 試薬(202 mg、0.48 mmol)、TEA(48 mg、0.48 mmol)及び Boc-Glu-O^{t}Bu(139 mg、0.46 mmol)を 20 mL 蒸留クロロホルム中で 12 時間反応させ、アミド結合を形成させた。飽和炭酸ナトリウム、及び水で分液を行い(クロロホルム相採取)、溶媒を減圧除去後、凍結乾燥し 27(80 mg、30 %)を得た。



化合物２７

化合物 27 の分析結果：

薄層クロマトグラフィー(シリカゲル、クロロホルム/メタノール(8/1)(容量/容量) : R_f: 0.71(モノスポット))

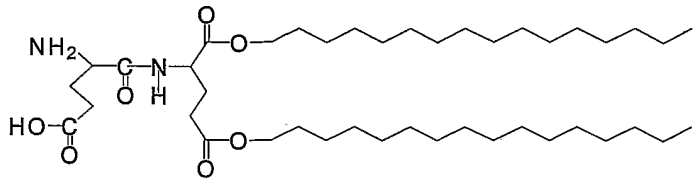
1H-NMR($CDCl_3$、500 MHz、 δ (ppm)) : 0.88 (t, 6H, -CH_3) ; 1.25 (m, 38H, -CH_2-, -Lys - β - γ -,CH_2-) ; 2.2 (m, 2H, -CH_2-N-CO-) ; 3.2 (t, 1H, -Lys-) ; 4.0 (t , 4H, -COO-CH_2-, -N-CO-CH_2-) ; 5.1 (b, 1H, -N-H-C-O-) ; 7.3(s, 1H, -Glu-CO-NH-)。

また、次のようにして、化合物 28 及び 29 を合成した。

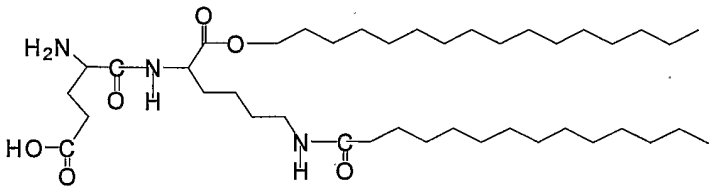
N-t-Boc-L-glutamic acid-g-butyl ester (764 mg、2.52 mmol)と DCC (513 mg、2.52 mmol)をジクロロメタンに溶解し、4℃で 30 分間撹拌した後、Glu2C16(1 g、1.68 mmol)を溶解したジクロロメタン溶液に滴下した。反応溶液を室温で 5 時間撹拌した後、反応液を濾過し、溶媒を減圧除去した。メタノールから 4℃で再結晶して濾過後、乾燥して Glu2C16 に親水部としてアミノ基およびカルボキシル基保護グルタミン酸を結合させた化合物を白色固体として得た(1.15 g)。この化合物を TFA 10 mL に溶解し、4℃で 2 時間撹拌した後、クロロホルムを加え、炭酸ナトリウム飽和水溶液で 2 回、純水で 2 回洗浄した。クロロホルム層を無水硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を減圧除去した。ベンゼンに溶解後、凍結乾燥し化合物

28(0.89 g)を白色粉末で得た。

化合物 29 は、化合物 27 の合成法と同様にし、lauric acid の代わりに myristic acid を用いた。



化合物２８



化合物２９

化合物 28 の分析結果：

薄層クロマトグラフィー(シリカゲル、クロロホルム/メタノール(4/1)(容量/容量) : R_f: 0.24(モノスポット))

1H-NMR($CDCl_3$、500 MHz、δ (ppm)) : 0.88 (t, 6H, $-CH_3$) ; 1.26 (m, 46H, $-CH_2-CH_2-$) ; 1.61 (m, 4H, $-CO-O-CH_2-$) 2.2 (m, 4H, glu β $-CH_2-$) ; 2.32、2.41 (m, 4H, glu γ $-CH_2-$) ; 3.4 (m , 1H, -CH-CON-) ; 4.07、4.12 (t, 4H, $-CO-O-CH_2-$) ; 4.51(m, 1H, -CH-CO-O-)

化合物 29 の分析結果：

薄層クロマトグラフィー(シリカゲル、クロロホルム/メタノール(8/1)(容量/容量) : R_f: 0.71(モノスポット))

1H-NMR($CDCl_3$、500 MHz、δ (ppm)) : 0.88 (t, 6H, $-CH_3$) ; 1.25 (m, 38H, $-CH_2-$, -Lys- β - γ -,CH_2-) ; 2.2 (m, 2H, $-CH_2-N-CO-$) ; 3.2 (t, 1H, -Lys-) ; 4.0 (t , 4H, $-COO-CH_2-$, $-N-CO-CH_2-$) ; 5.1 (b, 1H, -N-H-C-O-) ; 7.3(s, 1H, -Glu-CO-NH-)

2. リポソームの調製

1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC、29 mg、36mmol)、コレステロール (18 mg、48 mmol)、PEG-DSPE (2.1 mg、0.036 mmol)の混合脂質と、化合物 28 (26 mg、36 mmol)を 5 mL t-ブチルアルコールに溶解させて混合した後、凍結乾燥を行った。乾燥後、脂質濃度が 2 wt%になるようにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)に室温で 12 時間水和後、extrusion 法にて最終孔径 0.22μm まで透過させた。超遠心分離にて外水相を洗浄後、リン脂質定量値から濃度を調整し、粒径が 250 nm 程度のリポソームを調製した。

3. リポソームの分散安定度測定

調製したリポソームの安定度を、光散乱を用いた粒径測定より行った。その結果、化合物 28 の膜含有量によってリポソームの粒径は変化しなかった（表 7）。

表7 pH応答性リポソームの特性

混合脂質	モル比	粒径 [nm]
DOPC/chol/(28)/PEG-DPE	5/5/1/0.03	247 ± 101
	3/4/3/0.03	245 ± 98

4. リポソーム中での化合物 28 の低 pH による加水分解

調製したリポソーム(DOPC/chol/(28)/PEG-DPE=3/4/3/0.03、モル比)を 37℃、pH4.5 の PBS に分散させ、24 時間後に分散液を凍結乾燥した。乾燥させた混合脂質粉末をクロロホルムに溶解し、薄層クロマトグラフィー(シリカゲルプレート、クロロホルム/メタノール(8/1) (容量/容量)、検出:ヨウ素)にて検出した。検出結果は、図 8 に示した通りである。

化合物 28 の Rf=0.21 のスポットが消失し、新たに Rf=0.05 付近にスポットが見られた。これは化合物 28 が pH 4.5 で加水分解してリゾ体を生成したことによるものと思われる。

5. リポソームの低 pH における内包分子の放出促進

調製したリポソーム(DOPC/chol/(28)/PEG-DPE=3/4/3/0.03)の pH 応答性を検証

するために、内包分子にカチオン性蛍光 HPTS (1-hydroxypyrene-3,6,8-trisulfonic acid)を内包させた小胞体を調製し、蛍光色素の漏出を測定した。測定は、調製したリポソームをそれぞれの pH で 37℃の HEPES 緩衝液に添加し、10 分後に pH 7.4 に戻してから行った（λ_{ex}：413 nm, λ_{em}：512 nm）。HPTS は高濃度では消光しており、小胞体から漏出した HPTS が希釈によって蛍光を発する原理を利用して、膜の透過率（放出率）を以下の式 1.1 から算出した。

$$\text{released } \% = (I_x - I_0)/(I_T \times 1.1 - I_0) \qquad (1.1)$$

I_0：t=0(hr)における蛍光強度

I_x：t=x(hr)における蛍光強度

I_T：10%Triton-X 300 μL 加えたときの蛍光強度

各 pH における 10 分後の放出率を図 9 に示した。また、各 pH における経時的な内包分子の放出を測定した結果を図 10 に示した。図 10 中の記号はそれぞれ、(■) pH 3.5、(△) pH 4.5、(○) pH 5.5、(◇) pH 6.5、(□) pH 7.3、(▲) pH 11 における測定結果を表す。pH3.5 で約 20%の内包蛍光分子が放出したが、pH6 以上ではほとんど放出がされなかった。よって化合物 28 を膜成分としたリポソームは、低 pH によって化合物 28 が加水分解し、加水分解した化合物 28 のリゾ体はより親水性が高いために小胞体から遊離することに伴って、二分子膜の分子充填状態が乱れて内包蛍光分子の放出速度が高まったものと考察される。

さらに、化合物 28 および 29 のそれぞれ 10 mol%を膜成分としたリポソームを調製し、その pH 応答性についても検証した。

リポソームの調製は、前記「２．リポソーム調製」と同様にして行い、(DOPC/chol/(28 または 29)/PEG-DPE=5/5/1/0.03、モル比)を得た。その特性は表 7 に示したとおりである。

内包分子の放出は、前記と同様の方法で蛍光強度を測定し、その測定結果をもとに上記式 1.1 から算出した。各 pH における 10 分後の放出率を図 11 に示した。

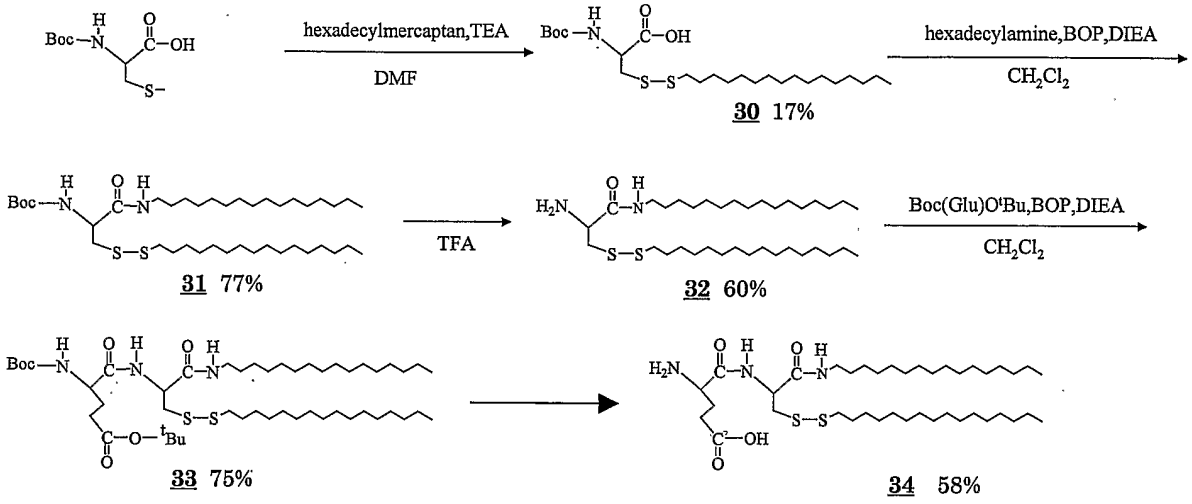
化合物 28 または 29 を膜成分（10 mol%）としたリポソームは、pH 4 において内包分子が急激に放出された。低 pH により放出率が増加することから、分解性

脂質（化合物 28 または 29）の加水分解により、生じたリゾ体が遊離し、その際リポソーム二分子膜の分子充填状態が乱れ、内包分子の放出が促進されたと考えられる。

〔実施例 6〕

1. ジスルフィド脂質の合成

下記のスキームに従い、疎水部にジスルフィド基を有するジスルフィド脂質を合成した。



(A) Nα,Nα'-di-Boc-L-cystine ((Boc-Cys-OH)$_2$) (2.64 g, 6 mmol)を DMF40 mL に溶解させ、TEA(7 mL, 50 mmol)に溶解させた hexadecylmercaptan(1.55 g, 6 mmol)を滴下した。40℃にて 2 時間反応させ、ジスルフィド結合を形成させた。溶媒除去後、ジエチルエーテルに溶解させ、飽和硫酸水素カリウム、飽和炭酸水素ナトリウム、塩化ナトリウムにて分液を行い(ジエチルエーテル層回収)、溶媒を減圧除去後、カラム（中性シリカゲル、クロロホルム/メタノール=9/1(容量/容量)）による精製を行い、化合物 30 を白色固体として得た(437 mg, 収率 16%)。

化合物 30 の分析結果：

薄層クロマトグラフィー(シリカゲル、クロロホルム/メタノール(9/1)(容量/容量) : R_f: 0.17(モノスポット))

1H-NMR($CDCl_3$ 、 500 MHz 、 δ (ppm)) :0.85(t,3H,-CH_3),1.23(br,26H,-CH_2-), 1.38(s,9H,Boc), 1.58(m,2H,S-CH_2-CH_2-), 2.69(t,2H,S-CH_2-), 2.93, 3.06(dd,1H,NH-CH(COOH)-CH_2-), 4.16(t,1H,NH-CH(COOH)-)

(B) 化合物 30(372 mg, 0.78 mmol)をジクロロメタン 20 mL に溶解させ、hexadecylamine(188 mg, 0.78 mmol)、DIEA(0.33 mL, 0.85 mmol)、BOP 試薬(442 mg, 1 mmol)を加え、室温にて 2 時間反応させ、アミド結合を形成させた。反応終了後、クロロホルムに溶解させ、飽和硫酸水素カリウム、飽和炭酸水素ナトリウム、塩化ナトリウムにより分液を行い（クロロホルム層回収）、溶媒を減圧除去後、60℃メタノールから再結晶を行い、化合物 31 を白色粉末として得た(420 mg, 収率 77%)。

化合物 31 の分析結果：

薄層クロマトグラフィー(シリカゲル、クロロホルム/メタノール(9/1)(容量/容量) : R_f: 0.90(モノスポット))

1H-NMR($CDCl_3$ 、 500 MHz 、 δ (ppm)) :0.88(t,6H,-CH_3), 1.25(br,52H,-CH_2-), 1.45(s,9H,Boc), 1.59(m,2H,NH-CH_2-CH_2-), 1.65(m,2H,S-CH_2-CH_2-), 2.71(t,2H,S-CH_2-), 3.02-3.04(dd,1H,NH-CH(COOH)-CH_2-), 3.24(t,2H,NH-CH_2-), 4.36(t,1H,NH-CH(COOH)-)

(C) 化合物 31 (415 mg, 0.59 mmol)を TFA20 mL に溶解させ、4℃、1 時間にて Boc 基の脱保護を行った。反応終了後、炭酸水素飽和ナトリウム、水にて分液を行い(クロロホルム層回収)、溶媒を減圧除去後、カラム(中性シリカゲル、クロロホルム/メタノール=30/1(容量/容量))による精製を行い、化合物 32 を白色粉末として得た(252 mg, 71%)。

化合物 32 の分析結果：

薄層クロマトグラフィー(シリカゲル、クロロホルム/メタノール(9/1)(容量/容量) : R_f: 0.68(モノスポット))

1H-NMR($CDCl_3$、500 MHz、δ (ppm)) :
0.88(t,6H,-CH_3), 1.25(br,52H,-CH_2-), 1.50(m,2H,NH-CH_2-CH_2-), 1.67(m,2H,S-CH_2-CH_2-), 2.70(t,2H,S-CH_2-), 3.23(t,2H-CONH-CH_2-), 3.29,3.31(dd,1H,NH-CH(COOH)-CH_2-), 3.68(t,2H,NH-CH(COOH)-)

(D) 化合物 32 (250 mg, 0.42 mmol) をジクロロメタン 15 ml に溶解させ DIEA(0.45 mL, 1.2 mmol)、Boc-Glu(OtBu)-OH(140 mg, 0,46 mol)、BOP 試薬をジクロロメタンと共に室温で 10 時間反応させ、アミド結合を形成した。反応終了後、クロロホルムに溶解させ、飽和硫酸水素カリウム、飽和炭酸水素ナトリウム、水にて分液を行い(クロロホルム層回収)、溶媒を減圧除去後 60℃メタノールから再結晶を行い、化合物 33 を白色粉末として得た(317 mg, 収率 85%)。

化合物 33 の分析結果：
薄層クロマトグラフィー(シリカゲル、クロロホルム/メタノール(9/1)(容量/容量) : R_f:0.84(モノスポット))
1H-NMR($CDCl_3$、500 MHz、δ (ppm)) :
0.87(t,6H,-CH_3), 1.25(br,52H,-CH_2-), 1.44,1.46(s,18H,Boc), 1.52(m,2H,NH-CH_2-CH_2-), 1.66(m,2H,S-CH_2-CH_2-), 1.85,2.17(dd,1H,-NH-CH(COOH)-CH_2-CH_2-), 2.33(t,2H,-CH_2-COO), 2.71(t,2H,-S-CH_2-), 3.07(d,2H,-CH_2-S-), 3.24(t,2H,CONH-CH_2-), 4.25(t,1H,Boc-NH-CH(COOH)-), 4.67(t,1H,-NH-CH(COOH)-)

(E) 化合物 33 (117 mg, 0.13 mmol)に TFA10 mL を加え、4℃にて 2.5 時間、Boc 基、O^{t}Bu 基の脱保護を行った。反応終了後、飽和炭酸ナトリウム、水にて分液を行い(クロロホルム層回収)、カラム(中性シリカゲル、クロロホルム/メタノール=9/1(容量/容量))により精製を行い化合物 34 (Glu-Cys-SC_{16})を白色粉末として得た(65 mg 収率 69 %)。

化合物 34 の分析結果：
薄層クロマトグラフィー(シリカゲル、クロロホルム/メタノール(4/1)(容量/容

量) : R_f:0.11(モノスポット))

1H-NMR($CDCl_3$、500 MHz、δ (ppm)) :

0.80(t,6H,-CH_3), 1.18(br,52H,-CH_2-), 1.42(m,2H,NH-CH_2-CH_2-), 1.58(m,2H,S-CH_2-CH_2-), 2.02, 2.09(dd,1H,-NH-CH(COOH)-CH_2-CH_2-), 2.40(t,2H,-CH_2-COO),2.62(t,2H,-S-CH_2-), 2.85,3.15(dd,2H,-CH_2-S-), 3.01(t,2H,CONH-CH_2-), 3.52(t,1H,NH_2-CH(COOH)-), 4.50(t,1H,-NH-CH(COOH)-)

2. リポソームの調製

DPPC、コレステロール、Glu-Cys-SC_{16}、PEG-Glu2C_{16} をモル比 3/4/3/0.03 にて混合させ、クロロホルムに若干のメタノールを添加して、最終濃度 5 wt%となるように溶解させた。溶解後、溶媒の除去、真空乾燥を経て混合脂質粉末を得た。カルセイン内包リポソームを得るため、混合脂質を 100 mM カルセイン水溶液(2 wt%)にて水和(r.t.,6 hr)後、高圧押出し法(フィルター孔径；5000 nm, 650 nm, 450 nm, 220 nm×2 回)にて粒径制御(φ=268±103 nm)した。未内包カルセインは SephadexG－75 カラムにて除去した。

濃度を変化（終濃度 10, 5, 1.0, 0.5, 0.1 mM）させた還元剤（システインまたはグルタチオン）水溶液に、調製したカルセイン内包リポソーム(総脂質濃度：1 mg/ml)を添加し、1 時間振とう後、pH 7.4 にて蛍光測定(λ_{ex}:488 nm, λ_{em}:517 nm)を行い、カルセイン放出率を以下の式から算出した。

カルセイン放出率「%」=(F_x－F_0)/(F_{100}－F_0)×100

F_x=還元後における蛍光強度

F_{100}=リポソームの完全可溶化後の蛍光強度

F_0=PBS にて 37℃1hr 静置後の蛍光強度

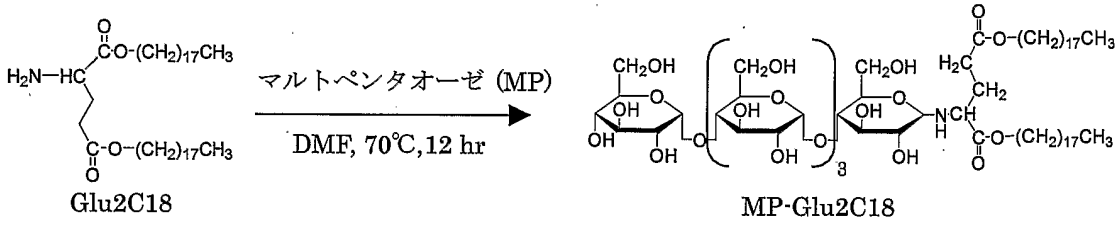
結果を図 12 に示す。図 12 中、-○-はシステイン添加系を示し、-□-はグルタチオン添加系を示す。図 12 に示されるとおり、膜成分として Glu-Cys-SC_{16} を混合したリポソームは還元剤の存在によりカルセインの放出が促進された。特にシステイン添加系では各濃度にて高い放出率を示したのに対し、グルタチオン添加系では濃度依存的に放出率は増大した。これは、システインの方が小胞体膜に対

して高い膜透過性と還元速度定数を持つため、Glu-Cys-SC_{16} のリゾ化がより早く進行し、リゾ体のリポソーム膜からの脱離に伴って内包カルセインが放出されたものと考えられる。またカルセインの放出率が 70%に留まったのは、すべての Glu-Cys-SC_{16} がリゾ体となって脱離した後安定な小胞体としてカルセインを保持したためと思われる。

〔実施例 7〕

1. マルトペンタオーゼ(MP)結合脂質の合成

下記のスキームに従い、マルトペンタオーゼ結合脂質を合成した。



Glu2C18 MP-Glu2C18

MP (0.25 g、0.302 mmol)、Glu2C18 (0.098 g、0.151 mmol)を DMF (2 mL)に溶解し、70℃で 12 時間攪拌した。ニンヒドリンにより Glu2C18 のアミンのスポットが消失したことを確認し、反応溶液をアセトンでの再沈殿と水洗いにより精製し、MP-Glu2C18 を白色粉末で得た(0.145 g、収率 66%)。

MP-Glu2C18 の分析結果：

TLC(シリカゲルプレート、クロロホルム/メタノール/水 (3/4/1) (v/v/v)：Rf：0.85 (モノスポット). IR(cm^{-1})：1736 [$\nu_{C=O}$ (amide)]；1676 [$\nu_{C=O}$ (amide)]；1553 [δ_{N-H} (amide)].

^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 500 MHz , δ (ppm))：0.8 (6H)；1.2 (60H)；1.5 (4H)；2.0 (2H)；2.3 (2H)；2.8～5.6 (56H)；7.9(1H).

2. MP 担持リポソームとコンカナバリン A（Con A）との複合体形成現象

MP-Glu2C18 を DPPC/cholesterol/DHSG=5/5/1（モル比）に対し、0, 0.3, 1, 2, 10 mol%導入し、10 mM HEPES バッファー(1 mM Ca^{2+},pH 7.4)にて調製したリポソーム溶液(0.5 mg/ml)に、D-グルコースや D-マンノースの認識部位を 4 つ持つレクチン Con A 水溶液(0.5 mg/ml)を添加して、水溶液の濁度(O.P.値、λ=600 nm)の経時変化を測定した。図 13 は、種々の MP-Glu2C18 導入率のリポソーム分散液に対して Con A 溶液を添加した際の分散液の濁度(O.P.値、λ=600 nm)の経時変化を示したグラフである。図 13 中、○は MP-Glu2C18 導入率 0 モル%、●は MP-Glu2C18 導入率 0.3 モル%、△は MP-Glu2C18 導入率 1 モル%、▲は MP-Glu2C18 導入率 2 モル%、□は MP-Glu2C18 導入率 10 モル%における経時変化を示す。Con A 水溶液の添加直後から溶液濁度の上昇が観察された。これは添加した Con A がリポソーム表面の糖鎖末端 D-グルコースを認識し、リポソーム間を架橋したためと考えられる。また、図 14 は、図 13 の 0.5 分後、5 分後の濁度(O.P.値、λ=600 nm)変化を MP-Glu2C18 導入率に対してプロットしたグラフである。図 14 中、○は 0.5 分後の濁度変化を示し、●は 5 分後の濁度変化を示す。リポソーム表面の MP-Glu2C18 導入量に依存して濁度の上昇が観察され、導入量 2 mol%以上で急激な濁度上昇が見られた。

3. MP 担持リポソームとコンカナバリン A（Con A）との複合体解離現象

図 15 は、2mol%MP-Glu2C18 導入リポソームに 1 mol%PEG 脂質(P125-2C14)を導入した系を、希釈倍率を変化させて希釈し、この系に Con A 溶液を添加した際の分散液の濁度(O.P.値、λ=600 nm)の経時変化を示したグラフである。MP-Glu2C18 を DPPC/cholesterol/DHSG=5/5/1（モル比）に対し 2 mol%導入し、10 mM HEPES バッファー(1 mM Ca^{2+},pH 7.4)にて調製したリポソーム分散液(0.5 mg/ml)に、Con A 水溶液(0.5 mg/ml)を添加すると、図 15 中の○で示すように、水溶液の濁度(O.P.値、λ=600 nm)が増加した。ここに 5 mM の EDTA を添加すると、図 15 中の●で示したとおり、濁度上昇が完全に抑制されることがわかった。このことから、Con A の糖認識に Ca^{2+}が必須であることが示唆された。

次に、1 mol%PEG 脂質(P125-2C14)溶液をリポソーム分散液の外水相に添加してリポソーム表面を PEG 鎖にて修飾すると、図 15 中の△に示したとおり、濁度

上昇が抑制されたことから、PEG 鎖の排除体積効果によりリポソーム表面 MP の認識障害が起き、機能が阻害された。この系を希釈率 20 倍（図 15 中の▲）、100 倍（図 15 中の□）、200 倍(図 15 中の▽)に希釈してから超遠心分離にてリポソームを分離し、再分散した溶液に Con A を同様に添加したところ、希釈倍率の上昇に伴う濁度の上昇が観察された。これはマスキングしたリポソーム表面からの PEG 脂質の脱離により、MP に対する Con A の認識能が発現したためと考えられる。

〔実施例８〕

1. H12-vesicle の調製

1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine (DSPE, 5 mg, 6.9 μ mol)をクロロホルム/メタノール混合溶媒(8/1 (v/v)) に溶解後、triethylamine (10.4 μ mol) 添加し攪拌させた(r.t., 10 min)。さらに、N-(ε -maleimidocaproyl) succinimide ester (EMCS, 21.3 mg, 69 μ mol)を添加し攪拌させた(r.t., 1 時間)。1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC, 253.2 mg, 350 μ mol)、cholesterol (106.5 mg, 280 μ mol)、DHSG (48 mg, 69 μ mol)を溶解させ、薄膜乾燥を経て、真空乾燥にて溶媒を除去した。純水 15 mL で水和・攪拌後、押出法にて粒径制御し(φ 0.8, 0.6, 0.45, 0.22 μ m)、遠心分離(100,000g, 30 min)にて未反応 EMCS や副生成物を除去、マレイミド基導入リン脂質小胞体(MAL-vesicle)を得た(4 wt%, 6 mL)。N 末端にあらかじめシステインを導入したドデカペプチド(H12, 100 mM, 100 μ L)を MAL-vesicle に添加し、振とうさせた(r.t., 12 時間)。遠心分離(100,000g, 30 min)にて未結合 H12 を除去し、H12-vesicle を得た。

小胞体表面の H12 結合量は，未結合 H12 を HPLC(TSK-GEL G3000PW$_{XL}$ column, 7.8 mm o.d. x 300 mm h, 1 mL/min, 36 %(v/v) アセトニトリル, 0.1 % (v/v) トリフフルオロ酢酸)にて定量し、逆算した。

2. PEG 導入 H12-vesicle (PEG(H12)vesicle)の調製

H12-vesicle 分散液(17 mM, 5 mL)に PEG 脂質（P125-2C14）水溶液(17.0 μ M, 15.8 mL)を混合後 37℃にて 2 時間撹拌した。さらに超遠心分離(33,000 rpm, 30

min)にて未導入 PEG 脂質を除去後、PEG 脂質導入小胞体(PEG(H12)vesicle)を得た。

3. H12-V の活性化血小板への特異的結合並びに PEG 鎖修飾による結合抑制(flow cytometry)

[方法]

洗浄ヒト血小板 (1.0×10^5 / μ L, 50 μ L)に $DiOC_{18}$ 標識した検体(vesicle、PEG-vesicle、H12-vesicle、PEG(H12)-vesicle、f.c. [lipid] = 0.5 mg/mL)を混合し、トロンビン(f.c. 3 U/mL)にて血小板を活性化させ，37 °C にて 10 分間振とうし、ホルムアルデヒド(f.c. 1 % (v/v))にて固定した。血小板分画の蛍光陽性率から、血小板への H12-vesicle の結合率を観察した。

[結果]

結果を図 16 に示した。$DiOC_{18}$ 標識 H12-vesicle 存在下、トロンビン刺激させた活性化血小板の蛍光陽性率をフローサイトメトリーにて測定したところ、85.6 %であり、H12-V は活性化血小板へ結合することを確認した。また、トロンビン未刺激時(2.1 %)、PAC-1 (活性化血小板上の GPIIb/IIIa に対する H12 の結合を阻害する抗体)存在下(3.1 %)では結合は抑制され、vesicle 存在下(2.3 %)も同様であった。従って、H12-vesicle は活性化血小板と特異的に結合することが明らかとなった。

PEG を後導入させた PEG(H12)-V で同様の実験を行ったところ、活性化血小板への結合率は、3.4 %へ減少した。これは、PEG の排除体積効果により、H12 の機能が阻害されたためと考えられる。

4. PEG(H12)vesicle の PEG 脂質の脱離に伴う活性化血小板への結合 (flow cytometry)

[方法]

PEG(H12)vesicle 分散液を PBS にて 0、6、300 倍に希釈し、振とうさせた(r.t., 1 時間)。遠心分離(100,000g, 30 min)にて濃縮し、希釈倍率を変えた 3 種類の PEG(H12)vesicle ([lipid] = 3 mg/mL)を得た。

洗浄血小板(1.0×10^5 / μL, 50 μL)に $DiOC_{18}$ 標識したそれぞれの PEG(H12)vesicle (f.c. [lipid] = 0.5 mg/mL)を混合し、トロンビン(f.c. 3 U/mL)にて血小板を活性化させ，37 °C にて 10 分間振とう、ホルムアルデヒド(f.c. 1 % (v/v))にて固定した。ポジティブコントロール群は PEG 未導入の H12-vesicle 添加時とし、ネガティブコントロール群は vesicle とした。血小板分画の蛍光陽性率から、血小板への PEG(H12)vesicle の結合率を観察した。結果を図 17 に示した。

[結果]

PEG(H12)-vesicle（図 17 では PEG(H12)-vesicle）の活性化血小板への結合率は 11.0 %であった。PEG(H12)-vesicle の希釈倍率の増大に伴い結合率は増大し、300 倍希釈後には H12-vesicle のそれとほぼ同等であった。このことから、希釈による PEG 脂質の脱離が促進され、H12 の機能が発現したと考えられる。

産業上の利用可能性

本発明の薬物運搬体は、外部環境の変化によって薬物動態を制御することができるので、各種疾患の予防・治療用の製剤として極めて有用である。

請 求 の 範 囲

1．薬物が担持されている分子集合体を含む薬物運搬体であって、その分子集合体を構成する一部の両親媒性分子が外部環境の変化によって分子集合体から遊離することによって、生体内における薬物動態が制御される薬物運搬体。

2．遊離する両親媒性分子が、

(薬物)－(結合部位Ａ)－(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)　　1

または

(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)－(結合部位Ｃ)－(薬物)　　2

［式中、結合部位Ａは親水部と薬物とを結合する部位であり、結合部位Ｂは親水部と疎水部とを結合する部位であり、結合部位Ｃは疎水部と薬物とを結合する部位である］で表されるものである請求の範囲第１項記載の薬物運搬体。

3．遊離する両親媒性分子が、

(親水性高分子)－(結合部位Ｄ)－(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)　　3

または

(認識部位)－(結合部位Ｅ)－(親水性高分子)－(結合部位Ｄ)－(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)　　4

［式中、結合部位Ｂは親水部と疎水部とを結合する部位であり、結合部位Ｄは親水性高分子と親水部とを結合する部位であり、結合部位Ｅは認識部位と親水性高分子とを結合する部位である］で表され、この両親媒性分子の遊離によって生体内における薬物動態が制御される請求の範囲第１項記載の薬物運搬体。

4．　(認識部位)－(結合部位Ｅ)－(親水部)―(結合部位Ｂ)－(疎水部)　　5

［式中、結合部位Ｂは親水部と疎水部とを結合する部位であり、結合部位Ｅは認識部位と親水部とを結合する部位である］で表される両親媒性分子５が担持されている分子集合体であって、該分子集合体に導入されている

(親水性高分子)－(結合部位Ｄ)－(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)　　3

［式中、結合部位Ｂは親水部と疎水部とを結合する部位であり、結合部位Ｄは親水性高分子と親水部とを結合する部位である］で表される両親媒性分子３が両親媒性分子５の認識を阻害する状態にあって、両親媒性分子３の遊離によって両親

媒性分子５の認識能が発現されることで生体内における薬物動態が制御されるものである請求の範囲第１項記載の薬物運搬体。

５．遊離する両親媒性分子の疎水部が２本以上１８本以下の炭化水素鎖を含有するものである請求の範囲第１項から第４項までのいずれかに記載の薬物運搬体。

６．遊離する両親媒性分子の結合部位Ｂにオリゴ糖鎖、オリゴペプチド鎖、ポリエステル鎖、ビニル系オリゴマーまたはデンドロン構造を含む請求の範囲第５項記載の薬物運搬体。

７．遊離する両親媒性分子が、

(薬物)－(結合部位Ａ)－(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)―(結合部位Ｂ)－(親水部)　6

または

(薬物)－(結合部位Ａ)－(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)―(結合部位Ｂ)－(親水部)－(結合部位Ａ)－(薬物)　7

［式中、結合部位Ａは薬物と親水部とを結合する部位であり、結合部位Ｂは親水部と疎水部とを結合する部位である］で表されるものである請求の範囲第１項記載の薬物運搬体。

８．遊離する両親媒性分子が、

(親水性高分子)－(結合部位Ｄ)－(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)―(結合部位Ｂ)－(親水部)　8

または

(親水性高分子)－(結合部位Ｄ)－(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)―(結合部位Ｂ)－(親水部)―(結合部位Ｄ)―(親水性高分子)　9

または

(認識部位)－(結合部位Ｅ)－(親水性高分子)－(結合部位Ｄ)－(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)－(結合部位Ｂ)－(親水部)―(結合部位Ｄ)―(親水性高分子)　１０

または

(認識部位)－(結合部位Ｅ)－(親水性高分子)－(結合部位Ｄ)－(親水部)－(結合部位Ｂ)－(疎水部)－(結合部位Ｂ)－(親水部)―(結合部位Ｄ)―(親水性高分子)－(結

合部位E)－(認識部位)　　１１

［式中、結合部位Ｂは親水部と疎水部とを結合する部位であり、結合部位Ｄは親水性高分子と親水部とを結合する部位であり、結合部位Ｅは認識部位と親水性高分子とを結合する部位である］で表され、この両親媒性分子の遊離によって生体内における薬物動態が制御されるものである請求の範囲第１項記載の薬物運搬体。

９．遊離する両親媒性分子の親水部または親水性高分子がポリエチレングリコールを含有するものである請求の範囲第１項から第８項までのいずれかに記載の薬物運搬体。

１０．分子集合体からの両親媒性分子の遊離が、この分子集合体の分散液の希釈によるものである請求の範囲第１項から第９項までのいずれかに記載の薬物運搬体。

１１．分子集合体からの両親媒性分子の遊離が、温度変化によるものである請求の範囲第１項から第１０項までのいずれかに記載の薬物運搬体。

１２．分子集合体からの両親媒性分子の遊離が、プロトン、アルカリ金属イオンおよびアルカリ土類金属イオンからなる群から選択される少なくとも１種の濃度変化によるものである請求の範囲第１項から第１１項までのいずれかに記載の薬物運搬体。

１３．遊離する両親媒性分子の親水部と疎水部とを結合する部位または疎水部に、エステル結合、アミド結合、ウレタン結合及びシッフ塩基からなる群から選択される少なくとも１種の結合を含有し、かつ分子集合体からの両親媒性分子の遊離がこれらの結合の加水分解によるものである請求の範囲第１項から第１２項までのいずれかに記載の薬物運搬体。

１４．遊離する両親媒性分子の親水部と疎水部とを結合する部位または疎水部にジスルフィド結合を含有し、かつ分子集合体からの両親媒性分子の遊離が、ジスルフィド結合の還元によるものである請求の範囲第１項から第１３項までのいずれかに記載の薬物運搬体。

１５．両親媒性分子の遊離に伴う分子集合構造の一部または全体的な破壊によって、分子集合体に保持されていた薬物が放出されるものである請求の範囲第１項から第１４項までのいずれかに記載の薬物運搬体。

１６．分子集合体が小胞体構造を有するものである請求の範囲第１項から第１５項までのいずれかに記載の薬物運搬体。

１７．両親媒性分子の遊離に伴う小胞体構造の一部または全体的な破壊によって、小胞体内水相に保持されていた薬物が放出されるものである請求の範囲第１６項記載の薬物運搬体。

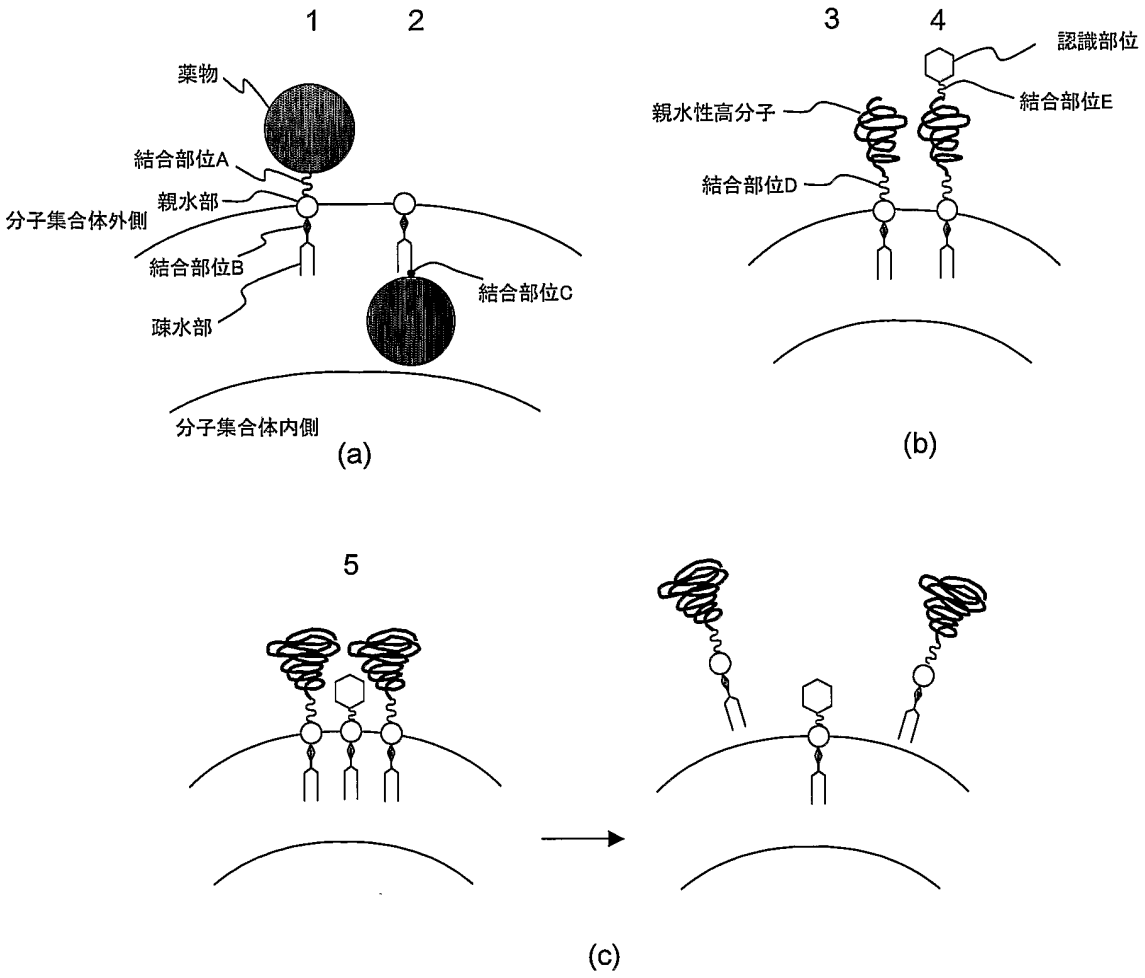
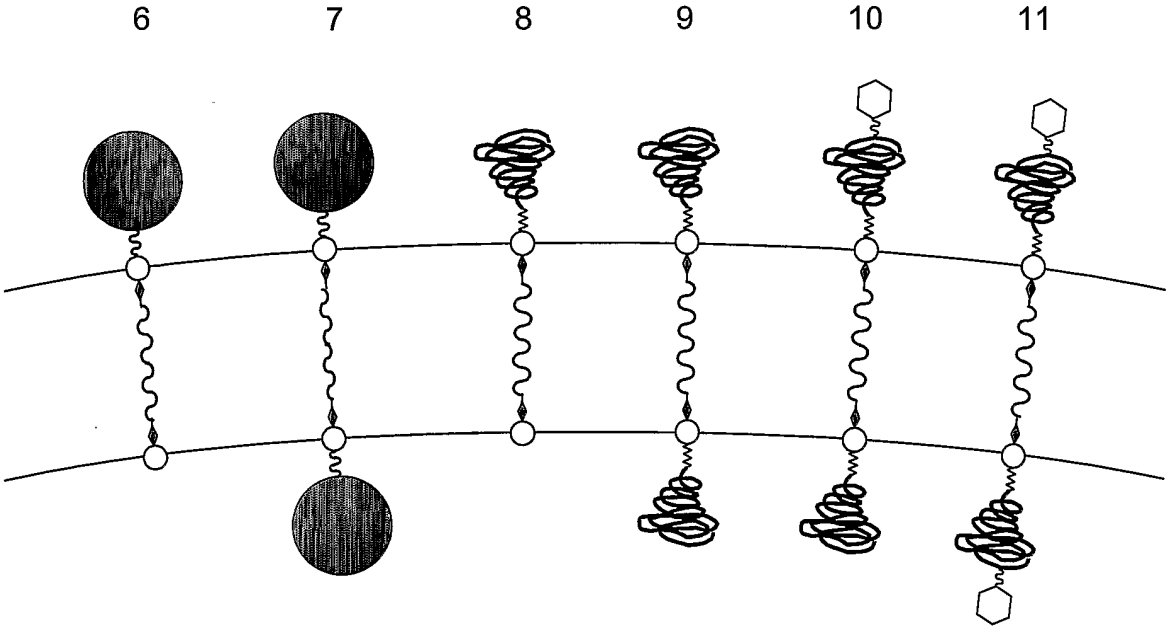

1
2
薬物
結合部位A
親水部
分子集合体外側
結合部位B
疎水部
結合部位C
分子集合体内側
(a)
3
4
認識部位
親水性高分子
結合部位E
結合部位D
(b)
5
(c)

Fig. 1A



(d)

Fig. 1B

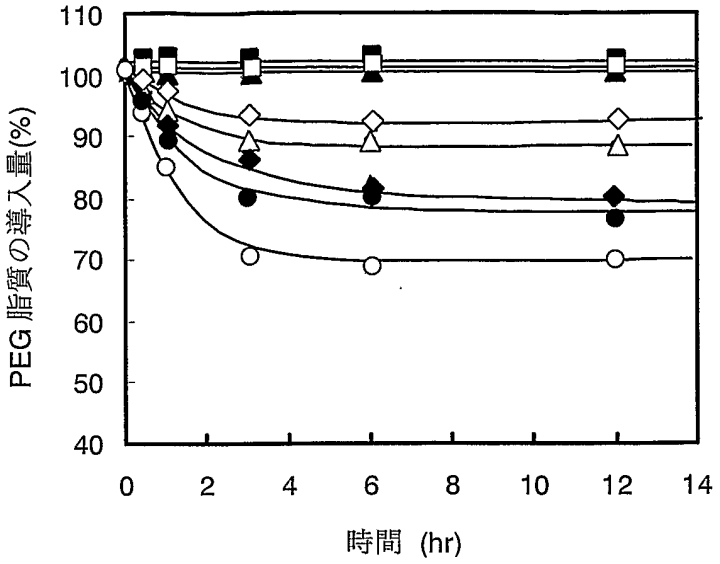

110
100
90
80
70
60
50
40
PEG 脂質の導入量(%)
0
2
4
6
8
10
12
14
時間 (hr)

Fig. 2

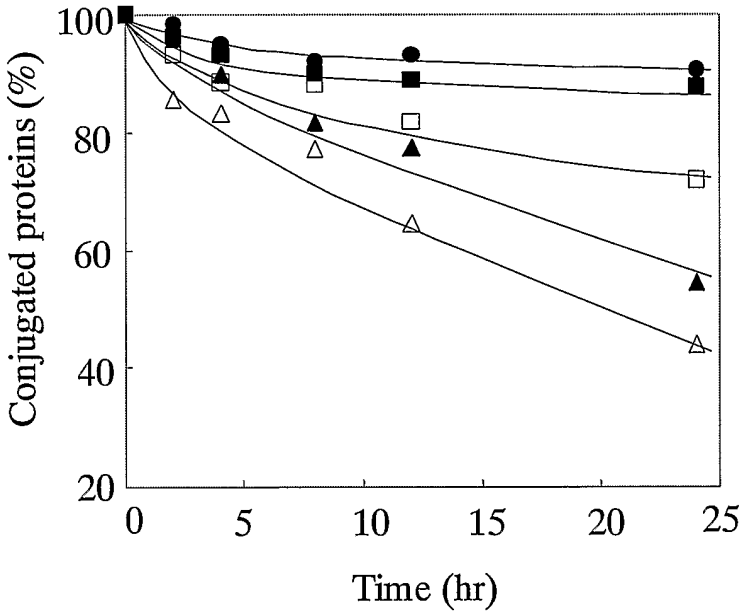

100
80
60
40
20
Conjugated proteins (%)
0
5
10
15
20
25
Time (hr)

Fig. 3

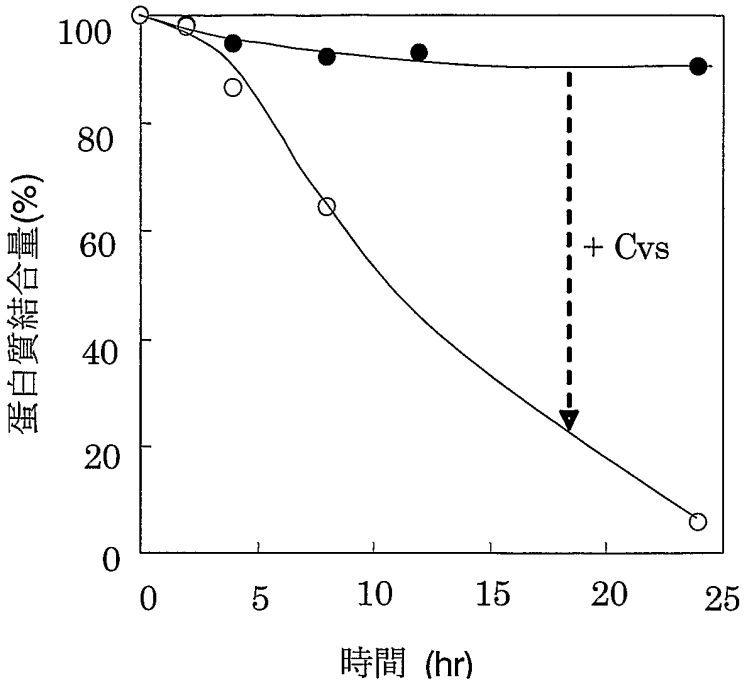

100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
蛋白質結合量(%)
時間 (hr)
+ Cvs

Fig. 4

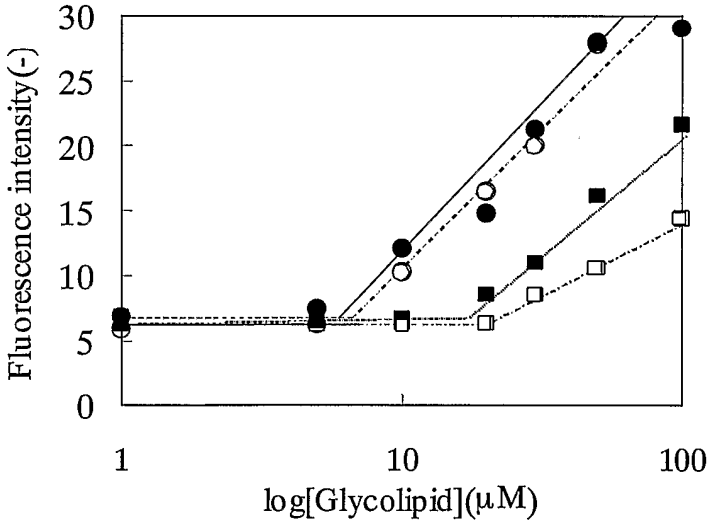
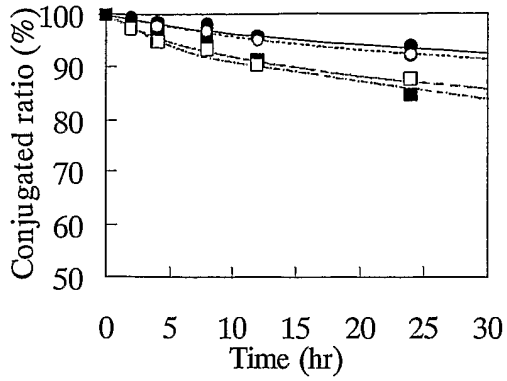
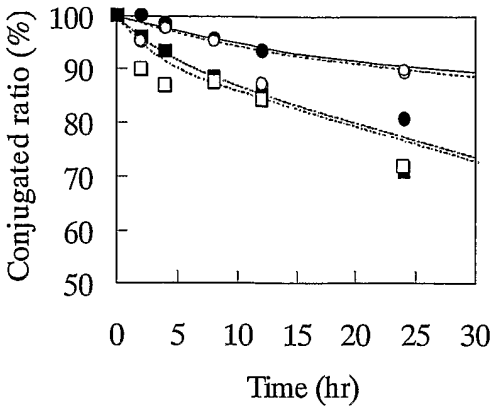

30
25
20
15
10
5
0
1
10
100
Fluorescence intensity(-)
log[Glycolipid](μM)

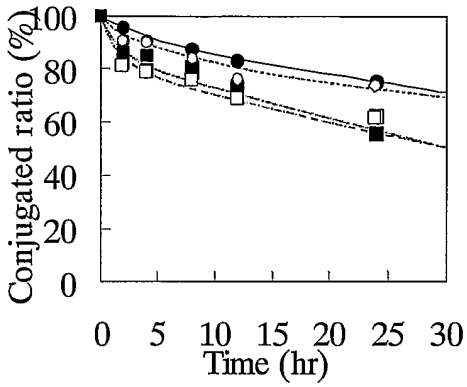
Fig. 5


Conjugated ratio (%)
100
90
80
70
60
50
0 5 10 15 20 25 30
Time (hr)

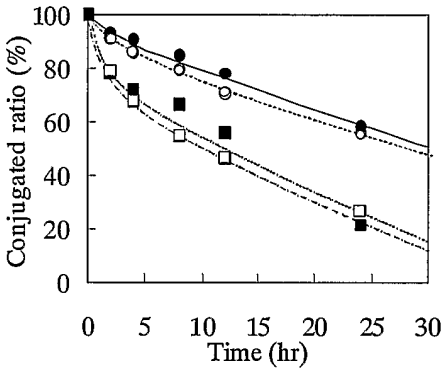
(a)


Conjugated ratio (%)
100
90
80
70
60
50
0 5 10 15 20 25 30
Time (hr)

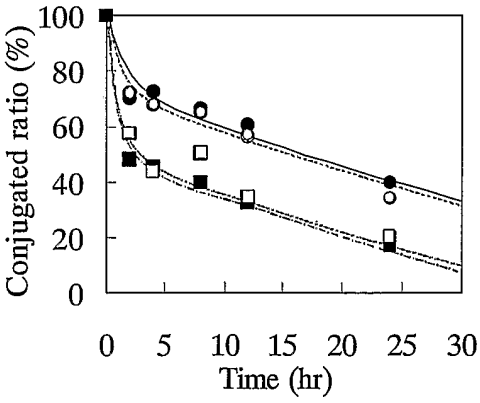
(b)


Conjugated ratio (%)
100
80
60
40
20
0
0 5 10 15 20 25 30
Time (hr)

(c)


Conjugated ratio (%)
100
80
60
40
20
0
0 5 10 15 20 25 30
Time (hr)

(d)


Conjugated ratio (%)
100
80
60
40
20
0
0 5 10 15 20 25 30
Time (hr)

(e)

Fig. 6

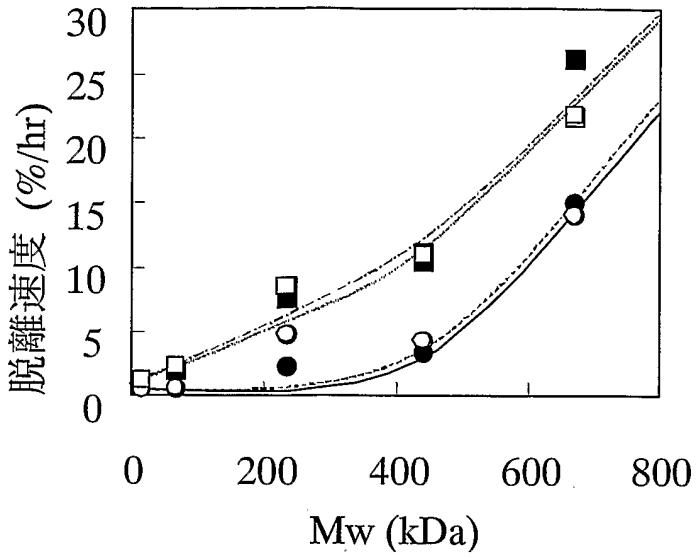

脱離速度 (%/hr)
30
25
20
15
10
5
0
0
200
400
600
800
Mw (kDa)

Fig. 7

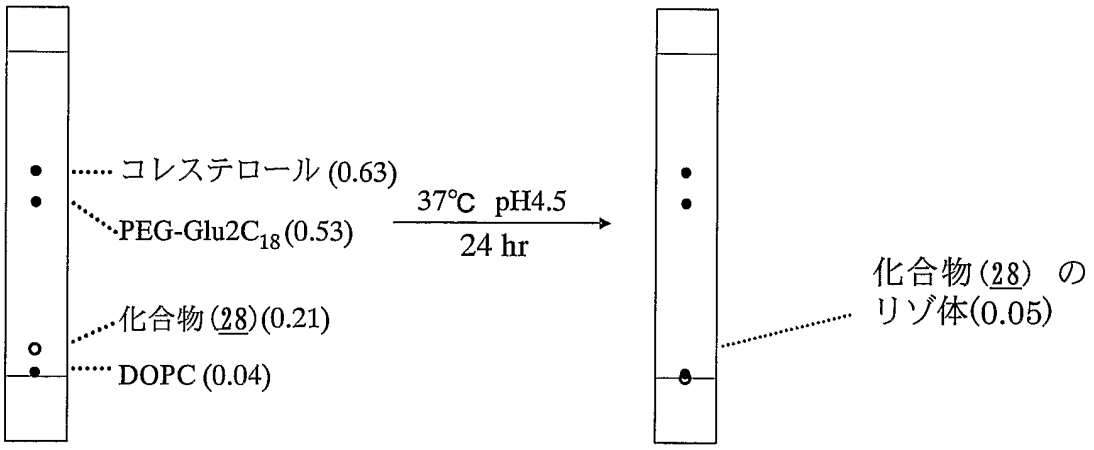

コレステロール (0.63)
PEG-Glu2C18 (0.53)
化合物 (28) (0.21)
DOPC (0.04)
37℃ pH4.5
24 hr
化合物 (28) の
リゾ体(0.05)

Fig. 8

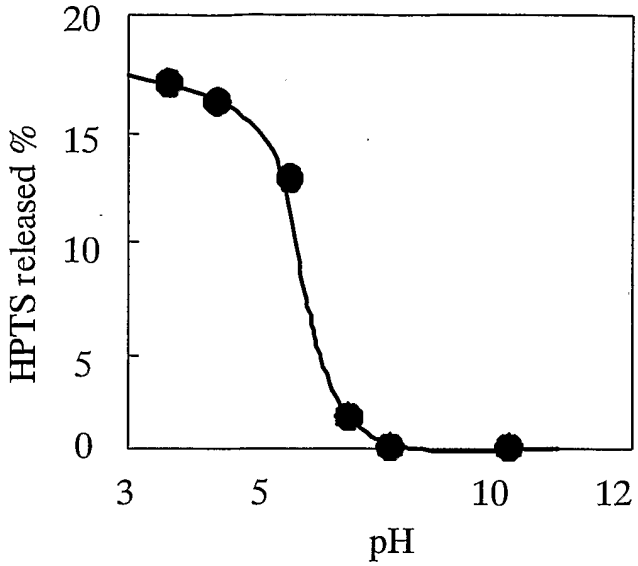

20
15
10
5
0
HPTS released %
3
5
10
12
pH

Fig. 9

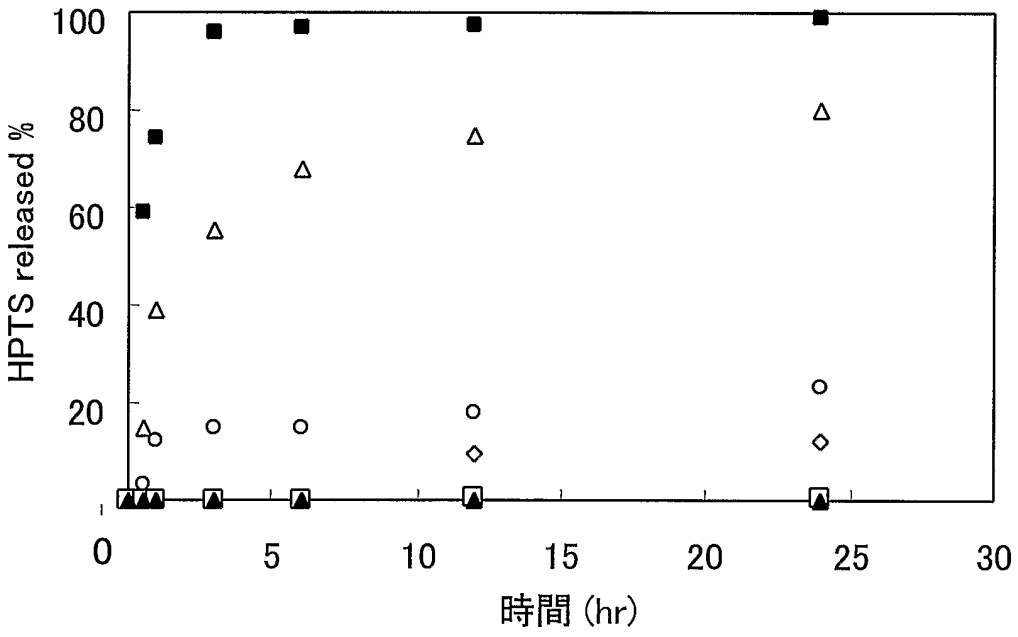
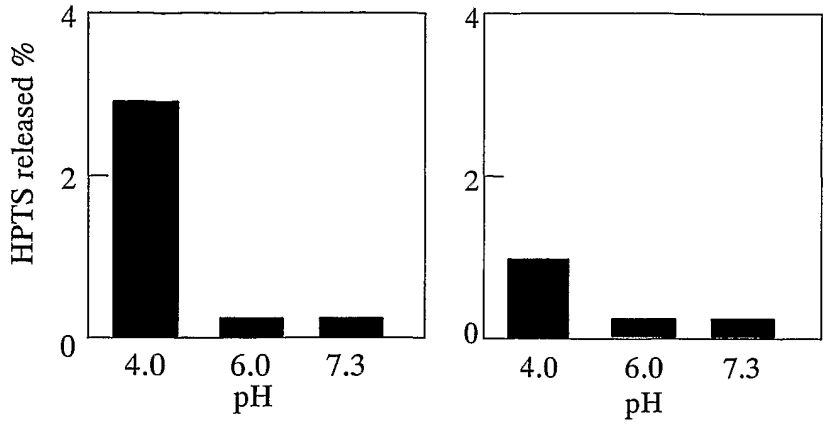

100
80
60
40
20
0
HPTS released %
0
5
10
15
20
25
30
時間 (hr)

Fig. 10



(a) (b)

Fig. 11

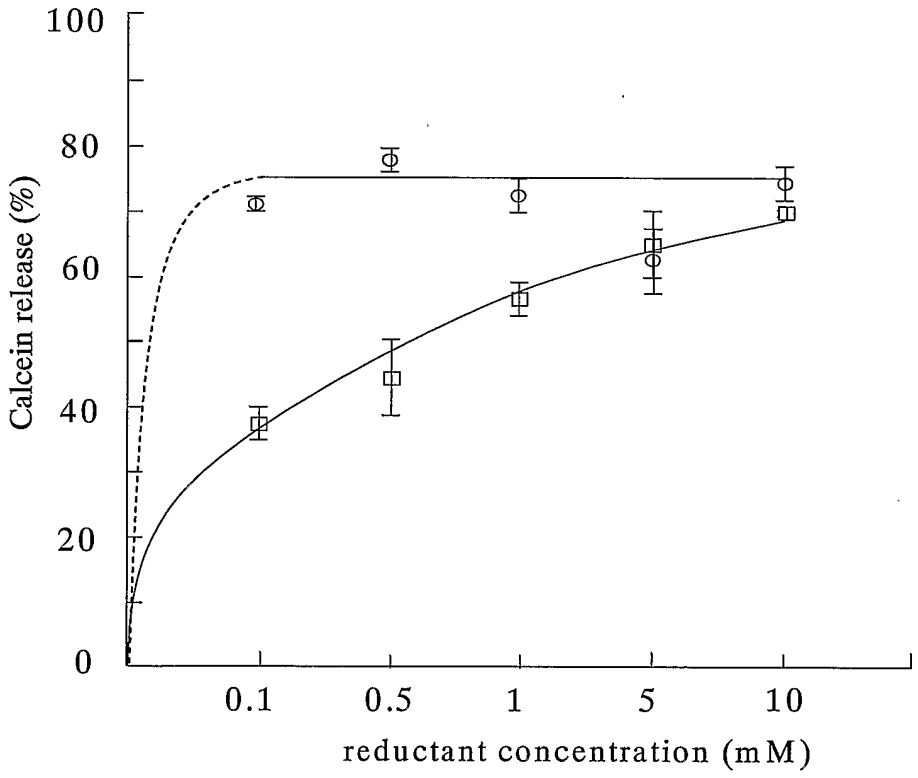


Fig. 12

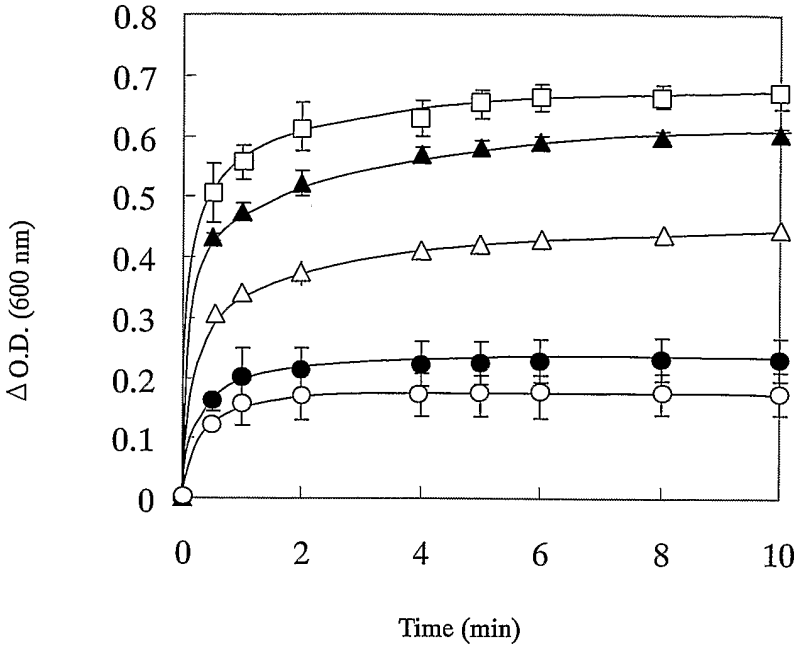

0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
2
4
6
8
10
Δ O.D. (600 nm)
Time (min)

Fig. 13

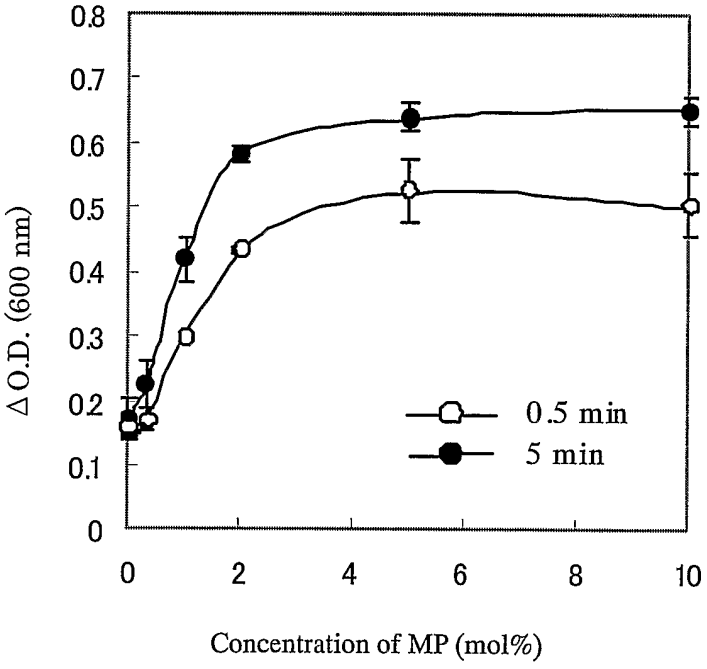

0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
2
4
6
8
10
Δ O.D. (600 nm)
0.5 min
5 min
Concentration of MP (mol%)

Fig. 14

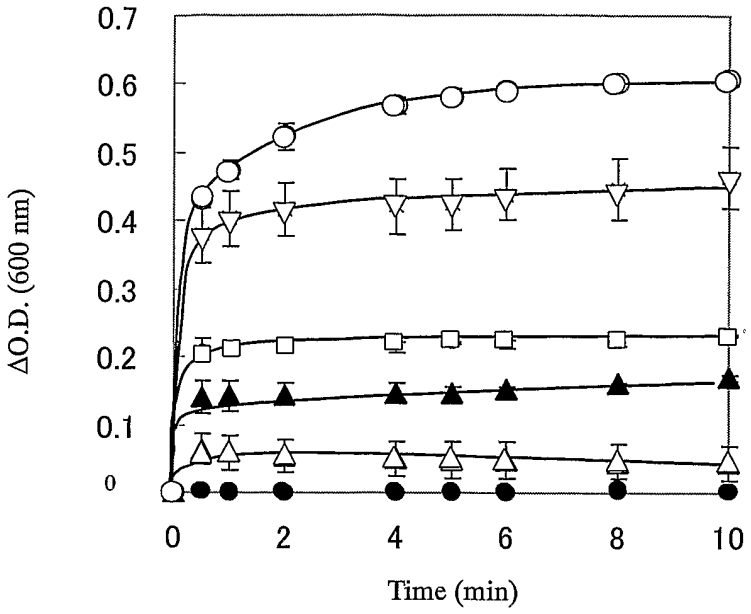

0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
ΔO.D. (600 nm)
0
2
4
6
8
10
Time (min)

Fig. 15

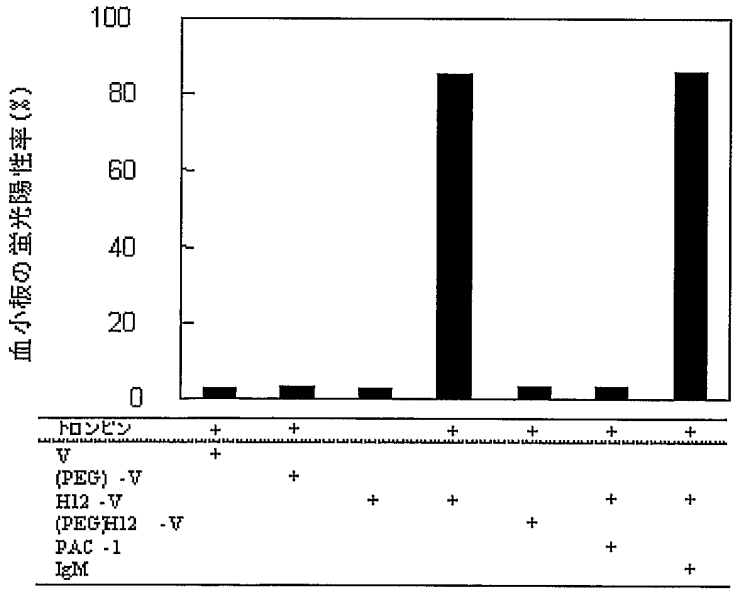

100
80
60
40
20
0
血小板の蛍光陽性率(%)
トロンビン + + + + + +
V +
(PEG) -V +
H12 -V + + + +
(PEG)H12 -V +
PAC -1 +
IgM +

Fig. 16

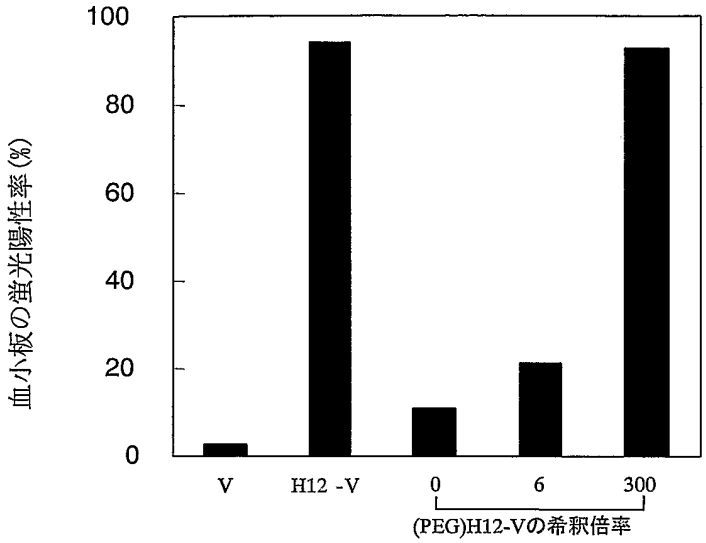


Fig. 17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2006/305304

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A61K9/127(2006.01), ***A61K47/34***(2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K9/127, A61K47/34

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2003-64037 A (Waseda University), 05 March, 2003 (05.03.03), Full text & WO 03/18539 A1 & EP 1420010 A1 & US 2004/162261 A1	1,5,6,15-17 2-4,7-14
Y	JP 2001-64383 A (Japan Science and Technology Corp.), 13 March, 2001 (13.03.01), Full text & WO 01/16211 A1 & EP 1219659 A1 & US 2002/120096 A1	2-4,7-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 May, 2006 (25.05.06)	06 June, 2006 (06.06.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2006/305304

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5356633 A (Liposome Technology, Inc.), 18 October, 1994 (18.10.94), Particularly, column 9, line 52 to column 10, line 16 & WO 94/07466 A1 & EP 662820 A1	2-4,7-14
Y	JP 2004-307404 A (Nipro Corp.), 04 November, 2004 (04.11.04), Particularly, Par. No. [0009] & EP 1466649 A1 & US 2004/258745 A1	2-4,7-14
Y	SILVIUS, J. R. et al., Interbilayer Transfer of Phospholipid-Anchored Macromolecules via Monomer Diffusion, Biochemistry, 1993, Vol.32, No.12, pages 3153 to 3161	2-4,7-14
A	JP 60-231609 A (Terumo Corp.), 18 November, 1985 (18.11.85), Full text & EP 160266 A1	1-17

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００６／３０５３０４

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　***A61K9/127*** (2006.01), ***A61K47/34*** (2006.01)

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K 9/127, A61K 47/34

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２００６年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２００６年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２００６年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X Y	JP 2003-64037 A (学校法人　早稲田大学) 2003.03.05, 全文 & WO 03/18539 A1 & EP 1420010 A1 & US 2004/162261 A1	1,5,6,15-17 2-4,7-14
Y	JP 2001-64383 A (科学技術振興事業団) 2001.03.13, 全文 & WO 01/16211 A1 & EP 1219659 A1 & US 2002/120096 A1	2-4,7-14

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 ２５．０５．２００６	国際調査報告の発送日 ０６．０６．２００６
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｃ　９４５０ 伊藤　幸司 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４５２

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Y	US 5356633 A (Liposome Technology, Inc.) 1994.10.18, 特に第9欄第52行－第10欄第16行 & WO 94/07466 A1 & EP 662820 A1	2-4,7-14
Y	JP 2004-307404 A (ニプロ株式会社) 2004.11.04, 特に[0009] & EP 1466649 A1 & US 2004/258745 A1	2-4,7-14
Y	SILVIUS, J. R. et al., Interbilayer Transfer of Phospholipid-Anchored Macromolecules via Monomer Diffusion, Biochemistry, 1993, Vol.32, No.12, pp.3153-3161	2-4,7-14
A	JP 60-231609 A (テルモ株式会社) 1985.11.18, 全文 & EP 160266 A1	1-17